

Facultad de Ciencias
Sede Bogotá



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia



REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS

Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.

ISSN 0034-7418, Fax: 3165060, Cra. 30 No. 45-03, Bogotá, D. C., Colombia.

Correo electrónico: rcquiifa_fcboq@unal.edu.co

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcquiifa>

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0034-7418&rep=

<https://scholar.google.com/citations?user=TyBT68sAAAJ&hl=es>

Rector Universidad Nacional de Colombia: Ignacio Mantilla Prada, Ph. D.

Vicerrector Sede Bogotá: Jaime Franky Rodríguez, M. Sc.

Decano Facultad de Ciencias: Jairo Alexis Rodríguez López, Ph. D.

Directora Departamento de Farmacia: Jorge Ariel Martínez Ramírez, Ph. D. (C)

Director Área Curricular de Farmacia: Maritza Adelina Rojas Cardozo, Ph. D.

Director-Editor Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas:

Fleming Martínez Rodríguez, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, correo electrónico:

fmartinezr@unal.edu.co

Comité Científico:

Alejandro Sosnik, Ph. D., Department of Materials Science and Engineering, Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel.

Carlos Bregni, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Juan M. Irache, Ph. D., Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, España.

Mario F. Guerrero, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

Mario G. de Carvalho, Ph. D., Departamento de Farmácia, Instituto de Ciências Naturais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil.

Martha R. Fontanilla, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

Rubén H. Manzo, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Victor Romanowski, Ph. D., Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Comité Editorial:

Abolghasem Jouyban, Ph. D., Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Alvaro F. Jiménez-Káiz, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Diego A. Chiappetta, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Fernão Castro Braga, Ph. D., Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

María A. Peña, Ph. D., Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Marta Concheiro, Ph. D., National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.

Paulo R. de Oliveira, Ph. D., Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro, Brasil.

Evaluadores:

Ali Shayanfar, Ph. D., Pharmaceutical Analysis Research Center and Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Islamic Republic of Iran.

Carolina Romaniuk, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Daniel R. Delgado, Ph. D., Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.

Eduardo Lagomarsino, Ph. D., Departamento de Farmacia Clínica y Asistencial, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Fleming Martínez, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

Guillermo Torrado, Ph. D., Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Héctor J. Prado, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

José M. Lozano, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

Marcela Moreton, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

María M. Blanco, Ph. D., Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Reinaldo G. Sotomayor, M. Sc., Área de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia.

Asistente editorial: Anyeli A. Rivera, B. A.

Edición, armada electrónica e impresión: Procceditor Ltda., Bogotá.

Teléfonos: 757 9200. Fax: ext. 102.

Correo electrónico: procceditor@yahoo.es

MISIÓN

La Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas es un órgano de difusión en el cual se publican investigaciones científicas, comunicaciones técnicas y revisiones temáticas originales en las áreas de las ciencias farmacéuticas (véanse Normas para publicación). La revista está destinada principalmente a químicos farmacéuticos, químicos, ingenieros químicos, médicos cirujanos, médicos veterinarios, y a otros profesionales de las ciencias físicas y naturales, de la ingeniería y de las profesiones sanitarias relacionadas con el uso de medicamentos.

VISIÓN

En pro de la difusión de las investigaciones, los contenidos de la Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas son de acceso libre, con ello se espera llegar a un número mayor de lectores, propiciando la consolidación de comunidades académicas. Además, se proyecta que los

contenidos publicados contribuyan al desarrollo e innovación de las ciencias farmacéuticas.

ÉTICA

La responsabilidad de lo expresado en cada artículo es exclusiva de los autores y no representa ni compromete posiciones de la revista ni del cuerpo editorial. Los contenidos publicados pueden reproducirse siempre que se cite la fuente respectiva. Esta revista sigue los lineamientos del COPE (Committee on Publication Ethics), que pueden ser consultados en <http://publicationethics.org/>

LICENCIA CREATIVE COMMONS



Todo el contenido de esta revista, excepto donde está identificado, está bajo una Licencia Creative Commons de atribución aprobada en Colombia. Consulte la normativa en http://co.creativecommons.org/?page_id=13

La totalidad de los números anteriores se encuentran disponibles en el sitio web: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcquiifa>

Contenido

A descrição matemática da análise eletroquímica do fármaco hidroxizina em soluções ácidas sobre um ácido sulfônico, baseado num polímero condutor

Volodymyr V. Tkach, Yana G. Ivanushko, Svitlana M. Lukanova, Lyudmyla V. Romaniv,
Sílvio C. de Oliveira, Reza Ojani, Olga V. Luganska, Petró I. Yagodynets' 121

Preferential solvation of tricin in {ethanol (1) + water (2)} mixtures at several temperatures

Juan José Sandoval-Castro, Claudia Patricia Ortiz, Juan Diego Rodríguez-Rubiano,
Gerson Andrés Rodríguez-Rodríguez, Daniel Ricardo Delgado 135

Percepción de usuarios de Cali-Colombia acerca de medicamentos genéricos

Camilo Torres Serna, David Altman Salcedo, Luisa María Fernández Rodríguez,
Luis Orozco Idrobo, Rodrigo A. Rosero Alayón 151

Evaluación de la publicidad de medicamentos y suplementos dietarios en un canal de televisión dentro de la franja horaria central

Angélica Andrea González-Acuña, Laura Dennis Vargas-Zapata,
José Julián López-Gutiérrez 169

Synthesis and physicochemical studies of vanillin chalcones

Shipra Baluja, Nayan Vakariya, Asmita Hirapara 185

Evaluación del impacto ambiental del proceso de modificación química de almidones nativos como potenciales excipientes en la industria cosmética

Melissa Soledad Caro Soto, Miladys Esther Torrenegra Alarcón,
María del Rosario Osorio Fortich, Glicerio León Méndez, Nerlis Paola Pajaro 217

Agentes dopaminérgicos centrales análogos *N*-aralquil metoxilados del 2-aminoindano

Geraldine Suárez Bozo, María Sanguino Díaz, Gerardo Lucena, Miriam Ocampo
Hernández, Lucía Rodríguez Villasmil, Katherin Balza Jiménez, Mariagracia Vera Sosa,
Ligia Ángel Migliore, Biagina Migliore de Ángel, Jaime Charris Charris, Anita Israel,
Simón López D' Sola, Rodolfo Izquierdo, José Caldera Luzardo, José Ortega Fernández,
María Ramírez Morán, Jorge Ángel Guío 233

Acetilación del almidón de millo (*Pennisetum glaucum*) y evaluación de su aplicación como posible excipiente

Alexander Sulbarán, Germán E. Matiz, Yolima Baena

255

Frequency of 14 genetic variants associated with breast cancer risk and treatment in a Colombian population

Yeimy Viviana Ariza Márquez, Fabio Ancízar Aristizábal Gutiérrez,
Alberto Gómez-Gutiérrez, Piedad Elena Gómez, María Consuelo Casas Gómez,
Ignacio Briceño Balcázar

277

Evaluación teórica del desempeño del electrodo, modificado por el oxihidróxido de cobalto (III) en la detección del ácido úrico

Volodymyr V. Tkach, Yana G. Ivanushko, Svitlana M. Lukanova, Marta V. Kushnir,
Sílvio C. de Oliveira, Reza Ojani, Olga V. Luganska, Petró I. Yagodynets'

289

Resúmenes de las presentaciones del IV Encuentro de Investigación de la Asociación Colombiana de Inmunología (ACOI), realizado en Neiva, Colombia, el 15 y 16 de marzo de 2018

301

A descrição matemática da análise eletroquímica do fármaco hidroxizina em soluções ácidas sobre um ácido sulfônico, baseado num polímero condutor

Volodymyr V. Tkach^{1,2}, Yana G. Ivanushko¹, Svitlana M. Lukanova¹, Lyudmyla V. Romaniv¹, Sílvio C. de Oliveira², Reza Ojani³, Olga V. Luganska⁴, Petró I. Yagodynets¹

¹ Universidade Nacional de Chernivtsi, 58012, Rua de Kotsyubyns'ky, 2, Chernivtsi, Ucrânia.

* Correio eletrônico: nightwatcher2401@gmail.com.

² Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Sen. Felinto. Müller, 1555, C/P. 549, 79074-460, Campo Grande, MS, Brazil.

³ Universidade de Mazandarã, 47416-95447, 3º km. da Rodovia de Forças Aéreas Iranianas, Babolsar, República Islâmica do Irã.

⁴ Universidade Nacional de Zaporizhzhya, 69600, Rua de Zhukovs'ky, 66, Zaporizhzhya, Ucrânia.

Recebido em: 09 de Novembro de 2016

Aceito em: 21 de Fevereiro de 2018

RESUMO

Um caso interessante da aplicação dos polímeros condutores funcionalizados na análise do fármaco hidroxizina em soluções ácidas vem sendo descrito do ponto de vista teórico. Um modelo matemático, correspondente ao caso, é desenvolvido e analisado mediante a teoria de estabilidade linear e da análise de bifurcações. Foi detectado que o uso de um polímero condutor de natureza ácida no processo pode deixar o uso das soluções menos ácidas do fármaco sem prejuízo para a eficiência eletroanalítica. Outrossim, foi avaliada a influência para o processo do comportamento dos grupos amina. A possibilidade das instabilidades oscilatória e monotônica também foi verificada.

Palavras-chave: hidroxizina, polímeros condutores, ácidos sulfônicos, sensores eletroquímicos, estado estacionário estável.

SUMMARY

The mathematical description for the electrochemical analysis of hydroxyzine drug in acid solution over a conducting-polymer based sulfonic acid

An interesting case of the application of the functionalized conducting polymer in the analysis of hydroxyzine drug in acid solutions is described from the theoretical point of view. A mathematical model, correspondent to the case, is developed and analyzed by means of linear stability theory and bifurcation analysis. It was detected that the use of an acid conducting polymer may permit the use of less acid solution without mischief of the electroanalytical efficiency. Moreover, the influence of the aminogroups' behavior to the process was also evaluated. The possibility of the oscillatory and monotonic instabilities has also been verified.

Key words: Hydroxyzine, conducting polymers, sulfonic acids, electrochemical sensors, stable steady-state.

INTRODUÇÃO

Hidroxizina, isto é, 2-[2-[4-[(4-clorofenil)-fenilmetil]piperazin-1-il]etoxi]etanol, (número CAS: 68-88-2) (Fig. 1) é um fármaco, derivado da piperazina, inibidor dos receptores H1 da histamina [1-4]. É utilizado no tratamento de dermatite atópica ou de contato, urticária e dermatografismo [5-8], no entanto, o seu uso também inclui os casos de diversas manifestações alérgicas e cistite [9-10]. Outrossim, ela pode ser usada como hipnótico, ansiolítico, no caso das ansiedades leves e moderadas, e no tratamento de cinetose (náuseas ou vômitos, induzidas por viagens e movimentos) [11-13].

Sem embargo, a sua ação mantém efeitos colaterais como tontura, sonolência, excitação e prisão de ventre [14-15]. Ademais, durante o seu uso duradouro e excessivo pelas mulheres grávidas pode levar às malformações do feto [16]. Destarte, o desenvolvimento de um método, capaz de detectar a sua concentração de forma mais eficiente, rápida, precisa e exata continua sendo uma tarefa atual [17-20].

Como hidroxizina é uma substância eletroquimicamente ativa, os métodos eletroquímicos podem ser aplicados a ela [21-23], e os polímeros condutores, capazes de combinar as propriedades dos plásticos com a condutividade metálica e de modificar-se facilmente [24-28], também poderiam ser usados na análise deste fármaco.

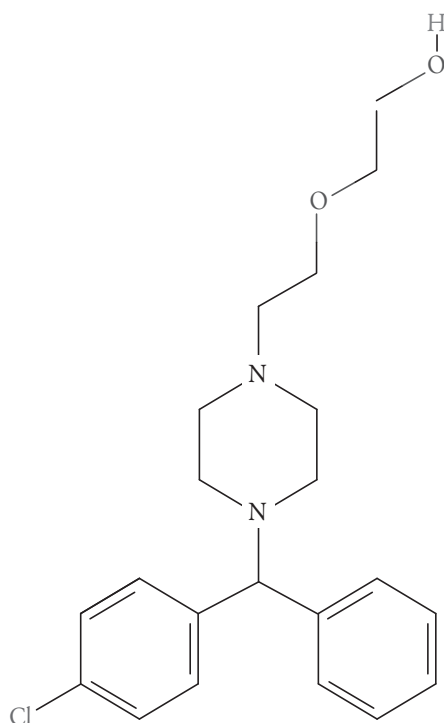


Figura 1. Hidroxizina.

No entretanto, o uso dos polímeros condutores pode acarretar alguns problemas como:

- o desconhecimento, particularmente, do mecanismo mais provável do desempenho do polímero condutor durante a eletrooxidação do fármaco e, geralmente, do comportamento do polímero na presença do fármaco;
- a possibilidade das instabilidades eletroquímicas, já observadas durante o desempenho dos polímeros condutores experimental [24-28] e teoricamente [29-34].

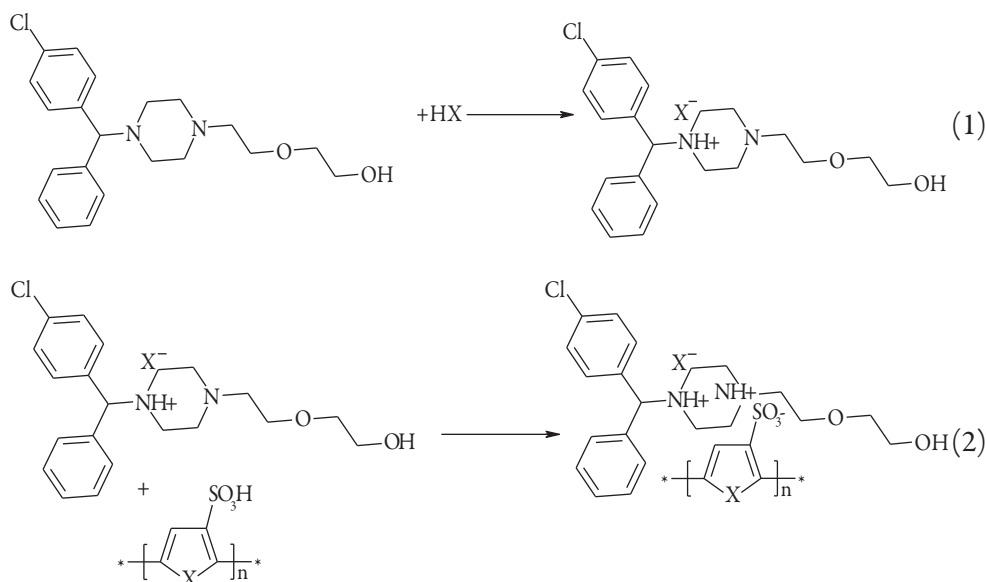
Ambos os problemas podem ser resolvidos por meio de uma análise mecanística do comportamento eletroquímico da hidroxizina na presença de um polímero condutor especificamente modificado, que se realiza por meio do desenvolvimento e da análise de um modelo matemático, capaz de descrever adequadamente o comportamento do sistema. A modelagem também dá possibilidade de compará-lo com o dos sistemas análogos.

Destarte, o objetivo geral deste trabalho é uma investigação teórica mecanística da eletrooxidação da hidroxizina em meios ácidos sobre um sulfoácido polimérico. Ele se realiza por meio da realização dos objetivos específicos como:

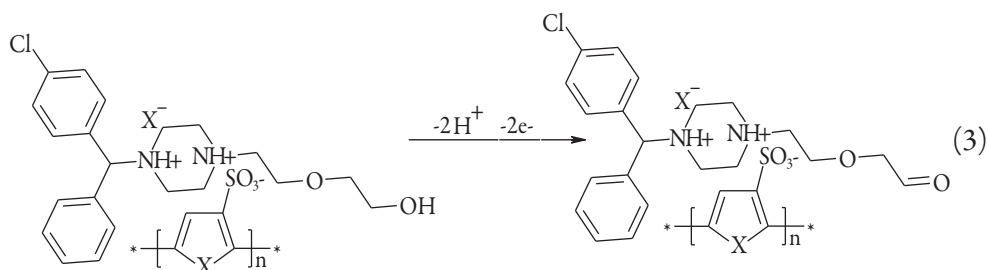
- desenvolvimento do modelo matemático de equações de balanço, que descreve o comportamento no sistema;
- análise do modelo;
- relação entre os resultados da análise do modelo e as observações experimentais;
- comparação do comportamento do sistema com o dos semelhantes [29-34].

O SISTEMA E O MODELO

O comportamento da hidroxizina na solução na presença do sulfoácido na superfície e de um outro ácido no eletrólito de suporte merece atenção e, destarte, descrever-se-á agora. Como o fármaco é um derivado de piperazina N,N-disubstituído, ele se comporta como uma diamina ternária, formando o sal duplo com ambos os ácidos. A quaternização na superfície faz com que o fármaco se imobilize com mais eficiência (vide as reações (1 – 2)). Obtém-se, destarte, um caso interessante de dopagem:



A eletrooxidação do fármaco imobilizado realize-se mediante a perda de dois prótons e dois elétrons da hidroxila, conforme a reação:



Em que X é um íon monovalente de um ácido forte, e X^- é um fragmento, que faz o polímero condutor aromático (- CH = CH - , - NH - , - S - , - Se - , em casos mais raros, - O -).

Haja vista o descrito em cima e o que se descreverá embaixo, introduzimos as três variáveis:

c : a concentração pré-superficial do fármaco não protonizado;

c^* : a concentração pré-superficial do fármaco pronizado pelo ácido, presente no eletrólito de suporte;

θ : o grau de recobrimento da superfície pelo polímero, dopado pelo fragmento do fármaco.

Para simplificar a modelagem, supomos que o reator esteja agitando-se intensamente (para menosprezar o fluxo de convecção), que o eletrólito de suporte esteja em excesso (para menosprezar o fluxo de migração e as despesas do ácido, nele presente). Também é suposto que a distribuição concentracional na camada pré-superficial seja lineal, e a sua espessura, constante, igual a δ . Supõe-se, também, que, no início da reação, o sulfoácido polimérico cubra a superfície inteira.

O fármaco entra na camada pré-superficial mediante a sua difusão e reage tanto com o ácido, presente no eletrólito de suporte, como com o ácido polímero condutor. Destarte, a sua equação de balanço descrever-se-á como:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) - r_1 - r_d \right) \quad (4)$$

Em que Δ é o seu coeficiente de difusão, c_0 é a concentração do fármaco no interior da solução, r_1 é a velocidade da reação (1) na camada pré-superficial, e r_d é a velocidade da reação do sulfoácido com o fármaco não protonizado.

Haja vista a presença do ácido no eletrólito de suporte, as moléculas monoprotonizadas do fármaco estão presentes, não só na camada pré-superficial, mas também no interior

da solução. Formando-se durante a reação (1), elas também se difundem do interior da solução, dopando, depois, o polímero conforme a reação (2). Assim sendo, apresentar-se-lhes-á a equação de balanço como:

$$\frac{dc^*}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (c_0^* - c^*) + r_1 - r_2 \right) \quad (5)$$

Em que c_0^* é a concentração das moléculas do fármaco protonizado no interior da solução, e r_2 é a velocidade da reação (2).

A dopagem do polímero pelos fragmentos do fármaco realiza-se tanto pela reação (2), como pela interação dos sulfogrupos com as moléculas não protonizadas da diamina ternária. Dopado, o polímero condutor modificado sofre a oxidação (3). Posto assim, a sua equação de balanço ver-se-á descrita como:

$$\frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{G} (r_d + r_2 - r_3) \quad (6)$$

em que G é a concentração máxima do polímero condutor, dopado pelo fármaco, e r_3 , reação da sua oxidação.

As velocidades das respectivas reações podem descrever-se como:

$$r_1 = k_1 c \quad (7)$$

$$r_d = k_d c (1 - \theta) \exp(\alpha \theta) \quad (8)$$

$$r_2 = k_2 c^* (1 - \theta) \exp(\alpha \theta) \quad (9)$$

$$r_3 = k_3 \theta \exp\left(\frac{2Fj\theta}{RT}\right) \quad (10)$$

Em que os parâmetros k são constantes das velocidades das respectivas reações, α e j descrevem as influências dos processos da dopagem e da eletrooxidação nas capacitâncias da dupla camada elétrica (DCE), F é o número de Faraday, R é a constante universal de gases e T é a temperatura absoluta.

Apesar de manifestar algumas semelhanças com os sistemas análogos [28-34], este sistema é diferente, haja vista que a dopagem dá influências para a DCE. O efeito destas influências no comportamento do sistema descrever-se-á embaixo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar o comportamento do sistema com eletrooxidação da hidroxizina em meio ácido sobre um polímero condutor, substituído por um grupo fortemente ácido, analisamos o conjunto de equações diferenciais (4-6) mediante a teoria de estabilidade linear. A matriz funcional de Jacobi, cujos elementos se calculam para o estado estacionário, pode ser descrita como:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \quad (11)$$

Em que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_1 - k_d c (1 - \theta) \exp(\alpha \theta) \right) \quad (12)$$

$$a_{12} = 0 \quad (13)$$

$$a_{13} = \frac{2}{\delta} (k_d c \exp(\alpha \theta) - \alpha k_d (1 - \theta) c \exp(\alpha \theta)) \quad (14)$$

$$a_{21} = \frac{2}{\delta} (k_1) \quad (15)$$

$$a_{22} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_2 (1 - \theta) \exp(\alpha \theta) \right) \quad (16)$$

$$a_{23} = \frac{2}{\delta} (k_2 \exp(\alpha \theta) - \alpha k_2 (1 - \theta) \exp(\alpha \theta)) \quad (17)$$

$$a_{31} = \frac{1}{G} (k_d (1 - \theta) \exp(\alpha \theta)) \quad (18)$$

$$a_{32} = \frac{1}{G} (k_2 (1 - \theta) \exp(\alpha \theta)) \quad (19)$$

$$a_{33} = \frac{1}{G} \left(-k_d c \exp(\alpha \theta) + \alpha k_d (1 - \theta) c \exp(\alpha \theta) - k_2 \exp(\alpha \theta) + \right. \\ \left. \alpha k_2 (1 - \theta) \exp(\alpha \theta) - k_3 \exp\left(\frac{2Fj\theta}{RT}\right) + jk_3 \theta \exp\left(\frac{2Fj\theta}{RT}\right) \right) \quad (20)$$

Observando os elementos (11), (16) e (20), é possível ver que a *instabilidade oscilatória*, neste caso, é possível. Outrossim, ela é mais provável que no caso comum do desempenho

eletroanalítico dos polímeros condutores, haja vista que há dois fatores responsáveis por tal comportamento contra um em [29-35].

O primeiro fator, comum para este sistema e os semelhantes, são as influências da oxidação eletroquímica nas capacitâncias da DCE. O comportamento oscilatório, causado por elas, descreve-se pela positividade do elemento $jk_3\theta\exp(\frac{2Fj\theta}{RT})$.

Já o segundo fator, específico para este sistema, são as influências do processo da dopagem nas capacitâncias da DCE. O comportamento oscilatório, causado por elas, descreve-se pela positividade dos elementos $\alpha k_d(1-\theta)c\exp(\alpha\theta)$ e $\alpha k_2(1-\theta)\exp(\alpha\theta)$.

Haja vista a presença dos dois fatores, as oscilações devem ser mais frequentes e de menor amplitude que em [29-35].

Para investigar a *estabilidade do estado estacionário*, aplicamos ao conjunto de equações diferenciais (4-6) o critério de Routh–Hurwitz. Para simplificar a matriz, evitando a aparição das expressões grandes durante a análise, introduzimos as novas variáveis, de modo que o determinante se descreve como:

$$\frac{4}{\delta^2 G} \begin{vmatrix} -\kappa - k_1 - \Xi & 0 & \Sigma \\ k_1 & -\kappa - \Lambda & P \\ \Xi & \Lambda & -\Sigma - P - X \end{vmatrix} \quad (21)$$

Abrindo os parênteses e aplicando a condição $\text{Det } J < 0$, saliente do critério, obtemos o requisito de estabilidade do estado estacionário sob a forma de:

$$(-\kappa - k_1 - \Xi)(\kappa\Sigma + \Lambda\Sigma + \kappa P + \kappa X + \Lambda X) + \Sigma(k_1\Lambda + \Xi\kappa + \Xi\Lambda) < 0 \quad (22)$$

Rearranjando a inequação (22) obter-se-á, após se aniquilarem os elementos de módulos iguais com signos diferentes, o requisito, expresso sob a forma de:

$$\begin{aligned} & -\kappa(\kappa\Sigma + \Lambda\Sigma + \kappa P + \kappa X + \Lambda X) - k_1(\kappa\Sigma + \kappa P + \kappa X + \Lambda X) \\ & -\Xi(\kappa P + \kappa X + \Lambda X) < 0 \end{aligned} \quad (23)$$

Este requisito é garantidamente satisfeito, no caso da positividade dos parâmetros Σ , P e X , que descreve a fraqueza das influências dos processos da dopagem e da reação eletroquímica nas capacitâncias da DCE. Deveras, sendo os mencionados parâmetros positivos, o valor da expressão do lado esquerdo da inequação deslocar-se-á para valores mais negativos, e o estado estacionário será mais estável.

Para efeitos eletroanalíticos, isto corresponde à linearidade da dependência entre o parâmetro eletroquímico e a concentração do analito. Destarte, é possível concluir que o sistema eletroanalítico é eficiente, e esta eficiência é fácil de manter.

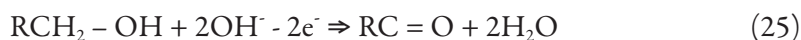
O processo, neste sistema, controlar-se-á pela difusão.

No caso da igualdade das influências estabilizadoras às desestabilizadoras, realizar-se-á a *instabilidade monotônica*, cuja aparição tem condição de

$$\begin{aligned} & -\kappa(\kappa\Sigma + \Lambda\Sigma + \kappa P + \kappa X + \Lambda X) - k_1(\kappa\Sigma + \kappa P + \kappa X + \Lambda X) \\ & -\Xi(\kappa P + \kappa X + \Lambda X) = 0 \end{aligned} \quad (24)$$

A sua realização é correspondente ao limite de detecção, e, neste ponto, coexistem vários estados estacionários, todos instáveis. Neste sistema, a instabilidade causar-se-á, maioritariamente, pelas influências da dopagem.

As *influências do pH*, neste sistema são importantes, já que os prótons tomam parte do processo eletroquímico. Geralmente, o pH conveniente para este tipo de reação eletroquímica é o neutro, ou levemente alcalino. No entanto, as soluções básicas promovem a oxidação direta química da hidroxila alcoólica:



que concorre com a oxidação eletroquímica, e as fortemente ácidas podem reverter a oxidação. Destarte, o pH da solução deve ser escolhido de modo que seja capaz de neutralizar as influências básicas do analito e, assim, na literatura foram usadas as soluções moderadamente ácidas, tendendo a fortemente ácidas, com pH = 2 ou 3.

Algo parecido se realizou no trabalho [35], em que para neutralizar o quitosano, um polímero expressamente básico, usou-se o pH baixo para que se obtivesse o meio neutro, conveniente para a oxidação do composto hidroquinônico sobre o líquido iônico neutro.

Neste sistema, como o polímero condutor é expressamente ácido, podem usar-se as soluções menos ácidas, com o pH=4, ou 5, sem prejuízo para a eficiência eletroanalítica do sistema.

Com mais detalhes a influência do pH nos sistemas como este, ou descrito em [35], descrever-se-á num dos nossos próximos trabalhos.

CONCLUSÕES

A avaliação teórica da possibilidade da detecção eletroquímica da hidroxizina em soluções ácidas sobre um polímero condutor, modificado por grupos expressamente ácidos, deixou concluir que:

- O estado estacionário, neste sistema, é garantidamente estável, sendo fracas as influências dos processos da dopagem e da reação eletroquímica nas capacitâncias da DCE;
- O sistema eletroanalítico é eficiente, e esta eficiência é fácil de manter;
- O processo eletroanalítico é controlado por difusão;
- A instabilidade oscilatória, neste caso, é possível, sendo causada não só pelos fatores das influências eletroquímicas na DCE, mas também pelos fatores das influências da dopagem;
- A instabilidade monotônica realiza-se, no caso da igualdade das influências estabilizadoras às desestabilizadoras, sendo causada, maioritariamente pelas influências da dopagem;
- Haja vista a presença de um ácido forte na superfície, é possível usar soluções menos ácidas que as indicadas na literatura para outros sistemas com a eletrodetecção da hidroxizina, sem prejuízo para o processo eletroanalítico.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. <https://www.drugs.com/hydroxyzine.html>, acesso aos 25 de outubro de 2016.
2. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hydroxyzine#section=Top>, acesso aos 25 de outubro de 2016.
3. F.E. Simons, K.J. Simons, E.M. Frieth, The pharmacokinetics and antihistaminic of the H1 receptor antagonist hydroxyzine, *J. All. Clin. Immunol.*, 73, 69 (1984).

4. A.M. Snowman, S.H. Snyder, Cetirizine: actions on neurotransmitter receptors, *J. All. Clin. Immunol.*, **86**, 1025 (1990).
5. E.W. Monroe, Relative efficacy and safety of loratadine, hydroxyzine, and placebo in chronic idiopathic urticaria and atopic dermatitis, *Clin. Ter.*, **14**, 17 (1992).
6. P.H. Deutsch, Dermatographism treated with hydroxyzine and cimetidine and ranitidine, *Ann. Intern. Med.*, **101**, 569 (1984).
7. D.L. Breneman, Cetirizine versus hydroxyzine and placebo in chronic idiopathic urticaria, *Ann. Pharmacoter.*, **30**, 1075 (1996).
8. S. Yadav, A.K. Balaj, Management of difficult urticaria, *Ind. J. Dermatol.*, **54**, 275 (2009).
9. <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/allergy/urticaria-and-angioedema> , acesso aos 25 de outubro de 2016.
10. T.C. Theoharides, G.R. Sant, Hydroxyzine therapy for interstitial cystitis, *Urology*, **49**, 108 (1997).
11. M. Gladney, R.T. Stanley, S.E. Hendricks, Anxiolytic activity of chloral hydrate and hydroxyzine, *Pediatr. Dent.*, **16**, 183 (1994).
12. http://www.cochrane.org/CD006815/DEPRESSN_hydroxyzine-for-generalised-anxiety-disorder, acesso aos 25 de outubro de 2016.
13. C.R. Brown, P.F. Schroff, W.H. Forrest Jr., The oral hypnotic bioassay of hydroxyzine and pentobarbital for nighttime sedation, *J. Clin. Pharmacol.*, **14**, 210 (1974).
14. <http://mentalhealthdaily.com/2016/01/06/hydroxyzine-side-effects-adverse-reactions-list/>, acesso aos 25 de outubro de 2016
15. <http://www.rxlist.com/atarax-side-effects-drug-center.htm>, acesso aos 25 de outubro de 2016
16. R. Shawky, N.S. Seifeldin, The relation between antihistamine medication during early pregnancy & birth defects, *Egypt. J. Med. Hum. Gen.*, **16**, 287 (2015).
17. M.A. Martínez-Gómez, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina-Hernández, Enantiomeric quality control of antihistamines in pharmaceuticals by affinity electrokinetic chromatography with human serum albumin as chiral selector, *Anal. Chim. Acta*, **592**, 20 (2007).

18. M.A. Brandão, L.G.B. Nascimento, H.C. Polonini *et al.*, A High performance liquid chromatography method for determination of hydroxyzine hydrochloride in syrup, *Lat. Am. J. Pharm.*, **30**, 1798 (2011).
19. M.E. Capella-Peiró, A. Bossi, J. Esteve-Romero, Optimization by factorial design of a capillary zone electrophoresis method for the simultaneous separation of antihistamines, *J. Anal. Biochem.*, **352**, 41 (2006).
20. N. Rajaenprasad, K. Basavaiah, K.B. Vinay, Optimized and validated spectrophotometric methods for the determination of hydroxyzine hydrochloride in pharmaceuticals and urine using iodine and picric acid, *J. Serb. Chem. Soc.*, **76**, 1551 (2011).
21. J. Scremin, E.R. Sartori, Square-wave voltammetric determination of antihistaminic drug hydroxyzine in pharmaceuticals using a Boron-doped diamond electrode, *Orbital Elec. J. Chem.*, **8**, 174 (2016).
22. A.M. Beltagi, O.M. Abdallah, M.M. Ghoneim, Development of a voltammetric procedure for assay of the antihistamine drug hydroxyzine at a glassy carbon electrode: Quantification and pharmacokinetic studies, *Talanta*, **74**, 851 (2008).
23. M. Javanbakh, S.E. Fard, A. Mohammadi *et al.*, Molecularly imprinted polymer based potentiometric sensor for the determination of hydroxyzine in tablets and biological fluids, *Anal. Chim. Acta*, **612**, 65 (2008).
24. J.P. Tosar-Rovira, “Estudio de la inmovilización de oligonucleótidos a electrodos modificados de oro: polipirrol, y detección electroquímica de secuencias complementarias”, Tesis Lic. Bioquím., Universidad de la República, Montevideo, 2008.
25. V.M. de Andrade, “Confecção de biossensores através da imobilização de bio-componentes por eletropolimerização de pirrol”, Tese M. Eng., UFRGS, Porto Alegre, 2006.
26. M.A. Sheikh-Mohseni, S. Pirs, Simultaneous determination of dopamine and acetaminophen by a carbon paste electrode doubly modified with poly (pyrrole) and CuO nanoparticles, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 777 (2016).
27. K. Mahantesha, B. Kumara Swamy, K. Vasantakumar Pai, Poly (alizarin) Modified glassy carbon electrode for the electrochemical investigation of omeprazole: A voltammetric study, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 234 (2014).
28. A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, A. Malinauskas, Electrochemical sensors based on conducting polymer–polypyrrole, *Electrochim. Acta*, **51**, 6025 (2006).

29. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', A investigação matemática do desempenho de biossensores eletroquímicos enzimáticos, baseados nos polímeros condutores, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **41**, 203 (2012).
30. V. Tkach, B. Kumara Swamy, R. Ojani *et al.*, El Mecanismo de la oxidación de omeprazol sobre el electrodo de carbono vitroso, modificado por polializarina, y su descripción matemática, *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 1 (2015).
31. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', El estudio de estabilidad en el proceso del desempeño de los sensores y biosensores, basados en los polímeros conductores en medio fuertemente ácido, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 30 (2013).
32. V. Tkach, B. Kumara-Swamy, R. Ojani *et al.*, O comportamento de paracetamol durante a sua oxidação eletrocatalítica sobre poli(azul da anilina) e a sua descrição matemática, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**, 148 (2015).
33. V. Tkach, V. Nechyporuk, P. Yagodynets', The mathematical stability study of the work of isomerization sensors, based on conduction polymers, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 273 (2014).
34. T. McQuade, A. Pullen, T.M. Swager, Conjugated polymer-based chemical sensors, *Chem. Rev.*, **100**, 2537 (2000).
35. L. Scarpetta, A. Mariño, K. Bolaños *et al.*, Determinación de hidroquinona usando un electrodo de carbono vítreo modificado con quitosano, nanotubos de carbono de pared múltiple y líquido iónico, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**, 311 (2015).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, Y.G. Ivanushko, S.M. Lukanova, L.V. Romaniv, S.C. de Oliveira, R. Ojani, O.V. Luganska, P.I. Yagodynets', A descrição matemática da análise eletroquímica do fármaco hidroxizina em soluções ácidas sobre um ácido sulfônico, baseado num polímero condutor, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(2), 121-133 (2018).

Preferential solvation of tricin in {ethanol (1) + water (2)} mixtures at several temperatures

Juan José Sandoval-Castro¹, Claudia Patricia Ortiz², Juan Diego Rodríguez-Rubiano³,
Gerson Andrés Rodríguez-Rodríguez⁴, Daniel Ricardo Delgado^{1*}

¹ Grupo de Investigaciones GRIAUCC, Programa de Ingeniería Industrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia, calle 11 No. 1-51, Neiva Huila, Colombia.

* E-mail: danielr.delgado@campusucc.edu.co.

² Grupo de Investigaciones en Seguridad y Salud en el Trabajo - FET, Programa de Administración de la Salud Ocupacional, Fundación Escuela Tecnológica de Neiva, Km. 11 vía al Sur, Neiva-Rivera, Colombia.

³ Programa de Ingeniería Industrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Antonio Nariño, sede Buganviles, calle 19 No. 42-98, Neiva Huila, Colombia.

⁴ Grupo de Investigaciones Farmacéutico-Fisicoquímicas, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Cra. 30 No. 45-03, Bogotá, D. C., Colombia.

Received: January 22, 2018

Accepted: February 23, 2018

SUMMARY

The preferential solvation parameters of tricin in {ethanol (1) + water (2)} binary mixtures were obtained from their thermodynamic properties by means of the inverse Kirkwood-Buff integrals method. Tricin is very sensitive to specific solvation effects, so the preferential solvation parameter by ethanol (1), $\delta x_{1,3}$, is negative in the water-rich mixtures but positive in all the other compositions at temperatures from 293.15, to 313.15 K. It is conjecturable that in water-rich mixtures the hydrophobic hydration around the aromatic and methyl groups of the drug plays a relevant role in the solvation. The higher drug solvation by ethanol in mixtures of similar solvent proportions and in ethanol-rich mixtures could be due mainly to polarity effects. In these mixtures, the drug would be acting as Lewis acid with the ethanol molecules because this co-solvent is more basic than water.

Key words: Tricin, IKBI, ethanol, preferential solvation.

RESUMEN

Solvatación preferencial de tricín en mezclas etanol + agua a varias temperaturas

Los parámetros de solvatación preferencial del tricín en mezclas {etanol (1) + agua (2)} se obtuvieron a partir de las propiedades termodinámicas de solución, mediante el método de las integrales inversas de Kirkwood-Buff. La tricína es muy sensible a los efectos de solvatación específicos, por lo que el parámetro de solvatación preferencial, $\delta x_{1,3}$, es negativo en las mezclas ricas en agua, pero positivo en todas las otras composiciones a temperaturas desde 293,15 hasta 313,15 K. Se puede establecer que en mezclas ricas en agua la hidratación hidrofóbica alrededor de los grupos aromáticos y metilo del fármaco tiene un papel relevante en la solvatación. La mayor solvatación del fármaco por etanol se presenta en mezclas de proporción intermedia y en mezclas ricas en etanol, esto podría deberse principalmente a los efectos de la polaridad. En estas mezclas, el fármaco actuaría como ácido de Lewis con las moléculas de etanol, puesto que este codisolvente es más básico que el agua.

Palabras clave: Tricina, IKBI, etanol, solvatación preferencial.

INTRODUCTION

Tricin (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)chromen-4-one) (Figure 1) is a flavone often found in the outer layer of cereal crops, has also been associated with reduction in cancer. In a mouse model of intestinal cancer, addition of tricín to the diet (0.2%, which was about 6 mg per mouse per day) resulted in 33% fewer intestinal adenomas [1]. In another study, dietary tricín was found to inhibit inflammation-induced colon cancer in mice [2]. Additional beneficial health effects of tricín are summarized in a recent review [3].

In foods tricín is mainly found in whole cereal grains, such as rice, barley, oat, and wheat, also, in medicinal plants such as *Artemisia copa* [4]. However, higher levels of tricín and its derivatives are often found in other nonedible tissues, such as leaves and grain hulls. Because of the potential therapeutic use of tricín and its derivatives, extraction from such nonedible sources has been proposed [5]. Tricin has also recently been found as a component of lignin in some species, particularly monocots [6].

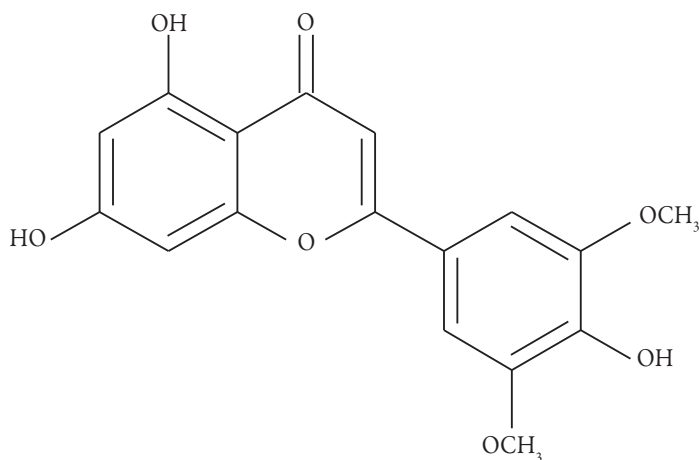


Figure 1. Molecular structure of triclin.

Within the context of this article, the studies of the solubility of drugs in solvent mixtures have as their purpose the modeling of the solubilities, with the aim of reducing the number of experimental tests, and in the best case, to bring them to zero [7-12]. Cheng *et al.* [13] determined the solubility of Tricin in {ethanol (1) + water (2)} cosolvent mixtures at different temperatures. Some thermodynamic functions associated to the dissolution of this drug were obtained, but nothing about the drug is preferentially solvated by water and by ethanol in the aqueous solvent mixtures. Nevertheless, more insight into the interactions of the drug molecules with those of the components of the mixed solvent would help in the choice of better co-solvents for the enhancement of drug solubilities in aqueous media [14-16].

The professor Marcus addressed this problem by means the inverse Kirkwood-Buff integral (IKBI) method [17,18]. Where the results are expressed in terms of the preferential solvation parameter $\delta x_{3,1}$ for the solute triclin (3) by the component solvents ethanol (1) and water (2):

$$\delta x_{1,3} = x_{3,1}^L - x_1 = -\delta x_{2,3} \quad (1)$$

where $\delta x_{3,1}$ is the local mole fraction of 1 in the surroundings of the solute 3 and x_1 is its mole fraction in the bulk solvent mixture. 3 is preferentially solvated by 1 when $\delta x_{3,1} > 0$, otherwise by 2. Negligible preferential solvation is indicated when $|\delta x_{3,1}| \leq 0.01$, but values $\delta x_{3,1} \approx x_2$ signify $\delta x_{3,1} \approx 1$ or complete selective solvation of 3 by 1. The magnitude and shape of the $\delta x_{3,1} = f(x_1)$ curve provide the desired information on the relative strength of the interactions of 3 with 1 and with 2 in their mixture.

In order to apply the IKBI method, the solubility data need to be transformed into standard molar Gibbs energies of transfer from one of the components, say 2, into the mixture 1+2. If x_2 is the solubility as a function of the solvent composition, then:

$$\Delta_{tr} G_{3,2 \rightarrow 1+2}^{\circ} = RT \ln \left(\frac{x_{3,2}}{x_{3,1+2}} \right) \quad (2)$$

THEORETICAL

Preferential solvation

The IKBI approach depends on obtaining the Kirkwood-Buff integrals as follows [17-22]

$$G_{1,3} = RT\kappa_T - V_3 + x_2 V_2 D / Q \quad (3)$$

$$G_{2,3} = RT\kappa_T - V_3 + x_1 V_1 D / Q \quad (4)$$

Here $G_{1,3}$ and $G_{2,3}$ are the Kirkwood-Buff integrals (in $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$) as obtained from the thermodynamic data: the isothermal compressibility of the solvent mixtures, κ_T (in GPa^{-1}), and standard partial molar volume of solute in this mixture, V_3 (in $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$). The functions

D and Q (in kJ mol^{-1} , as is RT) are given in equations (5) and (6), and depend on the first derivative of standard molar Gibbs energies of transfer, $\Delta_{tr} G^{\circ}$, and the second derivative of the excess Gibbs energy of mixing of the two solvents, G_{1+2}^E , with respect to the composition [23, 24].

$$D = \left(\frac{\partial \Delta_{tr} G_{(3,2 \rightarrow 1+2)}^{\circ}}{\partial x_1} \right)_{T,P} \quad (5)$$

$$Q = RT + x_1 x_2 \left[\frac{\partial^2 G_{1+2}^E}{\partial x_2^2} \right]_{T,p} \quad (6)$$

A final quantity that is required is the correlation volume around 3, V_{cor} , within which preferential solvation takes place and the local mole fraction, $x_{1,3}^L$, is defined [18, 25].

$$V_{cor} = 2522.5 \left[r_3 + 0.1363 \sqrt[3]{(1 - x_{1,3}^L) V_2 + x_{1,3}^L V_1 - 0.085} \right]^3 \quad (7)$$

This volume involves one solvation shell and depends on the size of the solute molecule (its radius, r_3 in nm, equation 8) plus a distance of one mean solvent diameter from the surface of the solute.

$$r_3 = \sqrt[3]{\frac{3 \times 10^{21} V_3}{4\pi N_A}} \quad (8)$$

The resulting correlation volume, in $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$, the numerical coefficients of which relate sizes to volumes, requires iteration, since it involves the local mole fractions of the two solvents.

Finally, the resulting preferential solvation parameter is then:

$$\delta x_{3,1} = \frac{x_1 x_2 (G_{1,3} - G_{2,3})}{x_1 G_{1,3} + x_2 G_{2,3} + V_{cor}} \quad (9)$$

However, the correlation volume requires iteration, because it depends on the local mole fractions [19, 26, 27].

RESULTS AND DISCUSSION

The experimental solubility of triclin (3) in {ethanol (1) + water (2)} mixtures (Fig. 2) was taken from the literature [13].

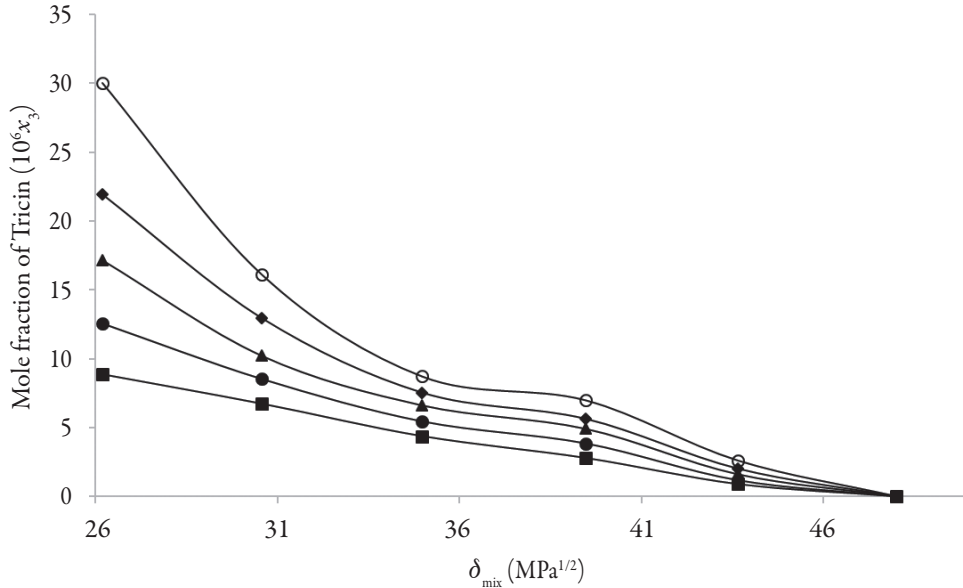


Figure 2. Experimental molar solubility of Triclin in {ethanol (1) + water (2)} mixtures at different temperatures; (■)=293.15 K; (●)=298.15 K; (▲)=303.15 K; (◆)=308.15 K; (○)= 313.15 K). Data taken from Cheng *et al.* (2016) [6]. ($10^6 x_3$).

The solubility increases with temperature in all cases indicating that the dissolution process is endothermic. The highest solubility of tricin (3) expressed as a mole fraction were obtained in near ethanol (1) at $T = 313.15$ K, whereas the lowest values were found in pure water (2) at 293.15 K (Figure 2).

On the other hand, Fig. 2 depict the solubility profiles as a function of the polarity of the mixtures, expressed by their solubility parameters (δ_{mix}). For a binary mixture δ_{mix} is calculated from the solubility parameters of the pure solvents ($\delta_1 = 26.5 \text{ MPa}^{1/2}$ and $\delta_2 = 47.9 \text{ MPa}^{1/2}$ [28, 29]).

The solubility parameter of solute, estimated according to the groups contribution method proposed by Fedors [21], is $\delta_3 = 34.44 \text{ MPa}^{1/2}$ (Table 1). Usually, the maximum solubility of a substance is found in a solvent or mixture of solvents with polarity similar to that of the solute. This behavior has been described by Delgado and Martinez in several investigations [30-37]. However, the experimental data did not present a maximum in a mixture but in pure ethanol (1).

Table 1. Application of the Fedors' method to estimate internal energy, molar volume, and Hildebrand solubility parameter of Tricin (3).

Group	Group number	V ($\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$)	U (kJ mol^{-1})
-CH ₃	2	2×33.5	1×4.71
>C=O	1	1×10.8	1×17.4
>C=	1	1×-5.5	1×4.31
-CH=	1	1×13.5	1×4.31
-OH	3	3×10	3×29.8
-O-	3	3×3.8	3×3.35
Phenyl (tetrasubstituted)	2	2×14.4	2×31.9
Ring closure	1	1×16.00	1×1.05
Conjugate bond	1	1×-2.2	1×1.67
	Total	169.8	201.4
	Solubility parameter	$(201410/169.8)^{1/2}$	$34.44 \text{ MPa}^{1/2}$

Preferential solvation

Standard molar Gibbs energy of transfer of tricin from neat water to {ethanol (1) + water (2)} mixtures is calculated and correlated to a non-regular polynomial from the

drug solubility data by using equation (10). Figure 3 shows the Gibbs energy of transfer behavior at 323.15 K. Thus, the coefficients of the polynomials are shown in Table 2.

$$\Delta_{tr} G_{3,2 \rightarrow 1+2}^0 = RT \ln \left(\frac{x_{3,2}}{x_{3,1+2}} \right) = a + bx_1 + cx_1^{1.5} + dx_1^2 + ex_1^{2.5} \quad (10)$$

Table 2. Coefficients of the equation (10) applied to the Gibbs energy of transfer of triclin (3) from neat water (2) to {ethanol (1) + water (2)} mixtures at several temperatures.

Coefficient kJ mol ⁻¹	293.15 K	298.15 K	303.15 K	308.15 K	313.15 K
<i>a</i>	0.00029	0.0023	0.0018	0.0032	0.0052
<i>b</i>	-289.49	-282.36	-281.80	-285.37	-282.00
<i>c</i>	722.40	683.54	675.90	706.07	697.87
<i>d</i>	-685.23	-624.59	-606.21	-654.99	-644.01
<i>e</i>	230.18	200.83	189.39	211.88	205.75

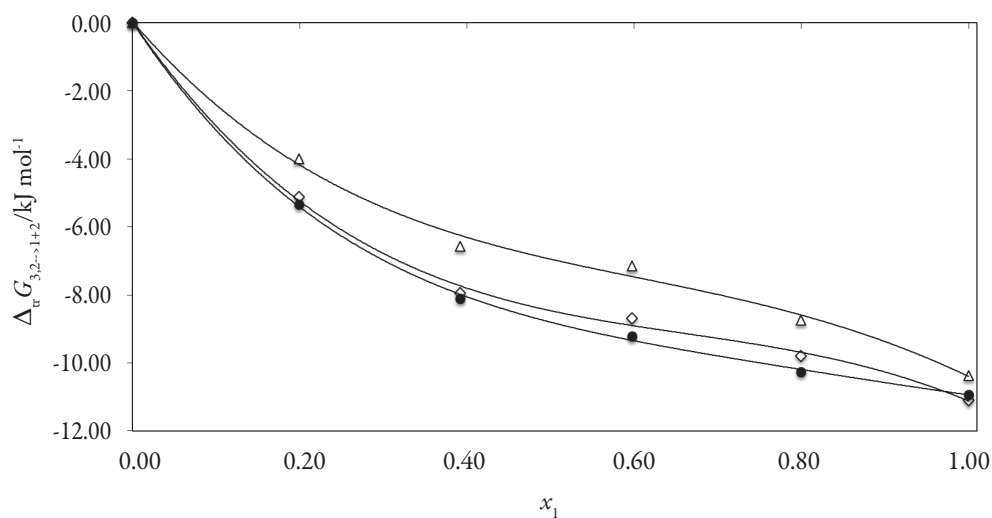


Figure 3. Gibbs energy of transfer of triclin (3) from neat water (2) to {ethanol (1) + water (2)} co-solvent mixtures at some temperatures (●=293.15 K; ◊=303.15 K; △=313.15 K).

Thus *D* values are calculated from the first derivative of polynomial models (Equation 11) solved according to the co-solvent mixtures composition. This procedure was done varying by 0.05 in mole fraction of methanol but in the following tables the respective values are reported varying only by 0.10.

$$D = \left(\frac{\partial \Delta_{\text{tr}} G_{(3,2 \rightarrow 1+2)}^0}{\partial x_2} \right)_{T,p} = b + 1,5cx_1^{0.5} + 2dx_1 + 2,5ex_1^{1.5} \quad (21)$$

Q and $RT \kappa_T$ values for {ethanol (1) + water (2)} binary mixtures, as well as the partial molar volumes of ethanol (1) and water (2), at the three temperatures considered here, were taken from the literature [22, 38, 39].

Otherwise, partial molar volumes of nonelectrolyte drugs are not frequently reported in the literature. This is because of the large uncertainty obtained in its determination due to their low solubilities, in particular in aqueous media. For this reason, in the first approach, the molar volume of tricin was considered as independent of co-solvent composition and temperature, as they are calculated according to the groups contribution method proposed by Fedors [29]. On the other hand, the radius of the drug molecule was calculated by using equation 8, as $r_3 = 0.407$ nm.

In order to apply the IKBI method, the correlation volume was iterated three times by using the equations (1), (7) and (9) to obtain the final values reported in Table 3. This property is almost independent on temperature in water-rich mixtures but increases to some extent in ethanol-rich mixtures. This would be expectable according to the variation of the respective molar expansibilities with the mixtures composition [40].

Table 3. Correlation volume ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$) for tricin in {ethanol (1) + water (2)} co-solvent mixtures at several temperatures after three iterations.

x_1	293.15 K	298.15 K	303.15 K	308.15 K	313.15 K
0.00	790.74	791.26	791.60	792.09	792.87
0.10	814.11	810.66	808.86	812.33	813.15
0.20	938.40	939.33	941.50	944.50	946.85
0.30	1033.69	1036.60	1039.18	1041.04	1043.50
0.40	1115.76	1118.16	1119.75	1122.04	1124.45
0.50	1196.96	1197.75	1198.42	1202.63	1205.53
0.60	1281.26	1280.71	1281.36	1288.19	1292.30
0.70	1363.04	1364.41	1367.61	1376.55	1383.36
0.80	1428.86	1435.71	1443.43	1451.91	1462.05
0.90	1485.75	1493.95	1501.84	1507.52	1516.46
1.00	1560.82	1566.06	1571.22	1576.68	1582.68

The preferential solvation parameter, $\delta x_{1,3}$ for ethanol (1) around tricin (3) is displayed in Fig. 4 at five temperatures. The values of $\delta x_{1,3}$ vary non-linearly with the proportion of ethanol (1) in the alcoholic mixtures (figure 4). The addition of ethanol to water causes a negative change in $\delta x_{1,3}$ from pure water (2) up to the 0.20 in molar fraction of ethanol (1) reaching minimum values near to -0.08 at 0.05 in molar fraction of ethanol at 303.15 K. In this composition, water is preferred over ethanol around the tricin (3), this because possibly the structuring of water molecules around the non-polar groups of this drug leading to hydrophobic hydration of the aromatic and methyl groups (Fig.1), contributes to lowering of the net $\delta x_{1,3}$ to negative values in these water-rich mixtures. This behavior is observed at all study temperatures as can be seen in Table 4. Although, a clear influence of the temperature in water-rich mixtures is not perceived, in ethanol-rich mixtures the solvation by ethanol increases with the increase in temperature what matches the solubility profile.

Table 4. $\delta x_{1,3}$ values of tricin (3) in {ethanol (1) + water (2)} co-solvent mixtures at several temperatures.

x_1	293.15 K	298.15 K	303.15 K	308.15 K	313.15 K
0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.10	-0.070	-0.075	-0.078	-0.075	-0.075
0.20	-0.012	-0.013	-0.013	-0.012	-0.012
0.30	0.010	0.011	0.010	0.009	0.009
0.40	0.016	0.015	0.013	0.012	0.011
0.50	0.022	0.019	0.015	0.016	0.015
0.60	0.034	0.027	0.023	0.028	0.027
0.70	0.043	0.038	0.037	0.044	0.046
0.80	0.032	0.034	0.039	0.044	0.051
0.90	0.009	0.014	0.018	0.019	0.023
1.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

In the mixtures with composition $0.25 < x_1 < 1.00$, the local mole fraction of ethanol is greater than the one in the bulk and it increases with the temperature increasing. In this way, the co-solvent action may be related to the breaking of the ordered structure of water (hydrogen bonds) around the nonpolar moieties of the drug which increases the solvation of the tricin and has a maximum value near to $x_1 = 0.75$, i.e. $\delta x_{1,3} = 0.052$. On the other hand, although, as mentioned above, the maximum solubility was not achieved in a cosolvent mixture, what would be expected theoretically, the maximum

solvation is achieved in mixtures with polarities similar to those of triclin (3), this factor could also be involved in these behaviors.

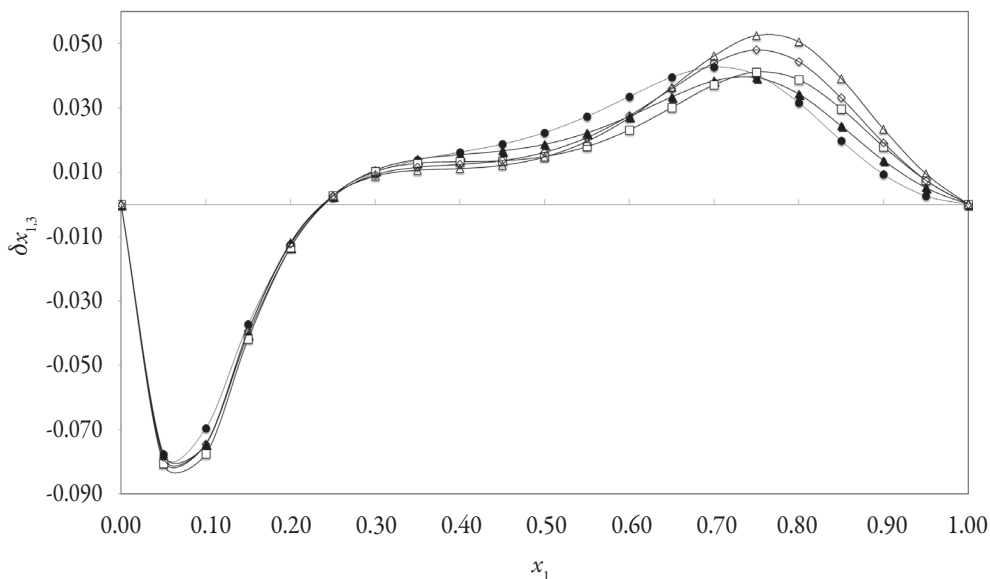


Figure 4. $\delta x_{1,3}$ values triclin (3) in {ethanol (1) + water (2)} co-solvent mixtures at several temperatures. (●=293.15 K; ▲=298.15 K; □=303.15 K; ◇=308.15 K; △=313.15 K).

The triclin (3) could act in solution as Lewis acids due to the hydrogen atom in their –OH groups in order to establish hydrogen bonds with proton-acceptor functional groups in EtOH and water (oxygen atom in –OH). In addition, these drugs could act as Lewis bases due to free electron pairs in oxygen atoms of hydroxyl and alkoxy groups to interact with hydrogen atoms present in both solvents. In this context, triclin has three hydrogen-bonding donor and seven hydrogen-bonding acceptor groups.

According to the preferential solvation results, it is conjecturable that in intermediate composition mixtures and ethanol-rich mixtures, triclin (3) is acting as Lewis acids with the ethanol molecules because this co-solvent is more basic than water as indicated by the Kamlet-Taft hydrogen bond acceptor parameters (β), i.e. 0.75 for ethanol (1) and 0.47 for water (2) [41,42]. In this way, triclin would prefer ethanol (1) instead of water. This behavior is similar to that presented by other drugs in aqueous cosolvent systems [27, 43, 44].

CONCLUSIONS

Explicit expressions for local mole fraction of ethanol and water around of triclin were derived on the basis of the IKBI method applied to equilibrium solubility values of this drug in {ethanol (1) + water (2)} mixtures. According to the performed analyses, triclin is preferentially solvated by water (2) in water-rich mixtures but preferentially solvated by ethanol (1) in mixtures with intermediate composition and those rich in ethanol at all temperatures considered.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. H. Cai, M. Al-Fayez, R.G. Tunstall, S. Platton, P. Greaves, W.P. Steward, A.J. Gescher, The rice bran constituent triclin potently inhibits cyclooxygenase enzymes and interferes with intestinal carcinogenesis in ApcMin mice, *Mol. Cancer Ther.*, **4**, 1287-1292 (2005).
2. T. Oyama, Y. Yasui, S. Sugie, M. Koketsu, K. Watanabe, T. Tanaka, Dietary triclin suppresses inflammation-related colon carcinogenesis in male Crj: CD-1 mice, *Cancer Prev. Res.*, **2**, 1031-1038 (2009).
3. M. Li, Y. Pu, C.G. Yoo, A.J. Ragauskas, The occurrence of triclin and its derivatives in plants, *Green Chem.*, **18**, 1439-1454 (2016).
4. V.A. Moscatelli, Química y farmacología de una planta medicinal argentina: *Artemisia copa*, *Dominguezia*, **31**, 5-13 (2015).
5. A. Moheb, M. Grondin, R.K. Ibrahim, R. Roy, F. Sarhan, Winter wheat hull (husk) is a valuable source for triclin, a potential selective cytotoxic agent, *Food Chem.*, **138**, 931-973 (2013).
6. W. Lan, J. Rencoret, F. Lu, S.D. Karlen, B.G. Smith, P.J. Harris, J.C. del Rio, J. Ralph, Triclin-lignins: Occurrence and quantitation of triclin in relation to phylogeny, *Plant J.*, **88**, 1046-1057 (2016).
7. A. Jouyban, W.E. Acree, Mathematical derivation of the Jouyban-Acree model to represent solute solubility data in mixed solvents at various temperatures, *J. Mol. Liq.*, **256**, 541-547 (2018).

8. N.A. Bowden, D. Méndez-Sevillano, J.P.M. Sanders, M.E. Bruins, Modelling the effects of ethanol on the solubility of the proteinogenic amino acids with the NRTL, Gude and Jouyban-Acree models, *Fluid Phase Equilib.*, **459**, 158-169 (2018).
9. M.A. Kalam, A.A. Khan, A. Alshamsan, A. Haque, F. Shakeel; Solubility of a poorly soluble immunosuppressant in different pure solvents: Measurement, correlation, thermodynamics and molecular interactions, *J. Mol. Liq.*, **249**, 53-60 (2018).
10. E. Rahimpour, M. Barzegar-Jalali, A. Shayanfar, A. Jouyban, Generally trained models to predict drug solubility in N-methyl-2-pyrrolidone + water mixtures at various temperatures, *J. Mol. Liq.*, **254**, 34-38 (2018).
11. A. Fathi-Azarbayjani, M.A. Jalil-Vaez-Gharamaleki, A. Jouyban, Measurement and correlation of deferiprone solubility: Investigation of solubility parameter and application of van't Hoff equation and Jouyban–Acree model, *J. Mol. Liq.*, **215**, 339-344 (2016).
12. M.A. Ruidiaz, D.R. Delgado, C.P. Mora, A. Yurquina, F. Martínez, Estimation of the indomethacin solubility in ethanol + water mixtures by the extended Hildebrand solubility approach, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **39**, 79-95 (2010).
13. Y. Cheng, Z. Wang, S. Ding, J. Li, Determination and correlation of the solubility of triclin in water and ethanol mixtures, *J. Chem. Thermodyn.*, **89**, 89-92 (2015).
14. G. Chen, J. Chen, C. Cheng, Y. Cong, C. Du, H. Zhao, Solubility and preferential solvation of econazole nitrate in binary solvent mixtures of methanol, ethanol and 1,4-dioxane in water, *J. Chem. Thermodyn.*, **111**, 228-237 (2017).
15. J. Chen, G. Chen, Y. Cong, C. Du, H. Zhao, Solubility modelling and preferential solvation of paclobutrazol in co-solvent mixtures of (ethanol, n-propanol and 1,4-dioxane) + water, *J. Chem. Thermodyn.*, **112**, 249-258 (2017).
16. A. Jouyban, W.E. Acree Jr., F. Martínez, Modeling the solubility and preferential solvation of gallic acid in cosolvent + water mixtures, *J. Mol. Liq.*, **224**, 502-506 (2016).
17. Y. Marcus, “Solvent Mixtures: Properties and Selective Solvation”, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002.
18. Y. Marcus, Preferential solvation of ibuprofen and naproxen in aqueous 1,2-propanediol, *Acta Chim. Slov.*, **56**, 40-44 (2009).

19. Y. Marcus, On the preferential solvation of drugs and PAHs in binary solvent mixtures, *J. Mol. Liq.*, **140**, 61-67 (2008).
20. D.I. Caviedes Rubio, R.G. Sotomayor, D.R. Delgado, Solvatación preferencial de la naringina en mezclas cosolventes etanol + agua mediante el método de las integrales inversas de Kirkwood-Buff, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**, 220-235 (2015).
21. D.R. Delgado, E.F. Vargas, F. Martínez, Preferential solvation of xylitol in ethanol + water solvent mixtures according to the IKBI and QLQC methods, *Rev. Colomb. Quím.*, **42**, 59-66 (2013).
22. D.R. Delgado, F. Martínez. Solubility and preferential solvation of sulfadiazine in methanol + water mixtures at several temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, **379**, 128-138 (2015).
23. D.R. Delgado, M.A. Peña, F. Martínez, Preferential solvation of some sulfonamides in propylene glycol + water solvent mixtures according to the IKBI and QLQC methods, *J. Solution Chem.*, **43**, 360-374 (2014).
24. D.R. Delgado, M.Á. Peña, F. Martínez, Preferential solvation of acetaminophen in ethanol + water solvent mixtures according to the inverse Kirkwood-Buff integrals method, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 298-314 (2013).
25. A.C. Gaviria-Castillo, J.D. Artunduaga-Tolé, J.D. Rodríguez-Rubiano, J.A. Zúñiga-Andrade, D.R. Delgado, A. Jouyban, F. Martínez, Solution thermodynamics and preferential solvation of triclocarban in {1, 4-dioxane (1) + water (2)} mixtures at 298.15 K, *Phys. Chem. Liq.*, Forthcoming 2018, doi: 10.1080/00319104.2017.1416613.
26. J.A. Lasso, D.I. Caviedes, D.R. Delgado, Preferential solvation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (DMHF) in ethanol + water mixtures according to IKBI and QLQC methods, *Ingeniería y Región*, **13**, 139-147 (2015).
27. A. Jouyban, S. Nozohouri, F. Martínez, Solubility of celecoxib in {2-propanol (1) + water (2)} mixtures at various temperatures: Experimental data and thermodynamic analysis *J. Mol. Liq.*, **254**, 1-7 (2018).
28. A.F.M. Barton, "Handbook of Solubility parameters and Other Cohesion Parameter", 2nd edition, CRC Press, Inc., New York, 1991.
29. R.F. Fedors, A method for estimating both the solubility parameters and molar volumes of liquids, *Polym. Eng. Sci.*, **14**, 147-154 (1974).

30. D.M. Jimenez, Z.J. Cárdenas, D.R. Delgado, M.Á. Peña, F. Martínez, Solubility temperature dependence and preferential solvation of sulfadiazine in 1,4-dioxane + water co-solvent mixtures, *Fluid Phase Equilib.*, **397**, 26-36 (2015).
31. D.R. Delgado, A.R. Holguín, O.A. Almanza, F. Martínez, Y. Marcus, Solubility and preferential solvation of meloxicam in ethanol + water mixtures, *Fluid Phase Equilib.*, **305**, 88-95 (2011).
32. D.R. Delgado, F. Martínez, Solubility and preferential solvation of sulfadiazine in methanol + water mixtures at several temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, **379**, 128-138 (2014).
33. D.R. Delgado, F. Martínez, Solubility and solution thermodynamics of sulfamerazine and sulfamethazine in some ethanol + water mixtures, *Fluid Phase Equilib.*, **360**, 88-96 (2013).
34. E.A. Ahumada, D.R. Delgado, F. Martínez. Solution thermodynamics of acetaminophen in some PEG 400 + water mixtures, *Fluid Phase Equilib.*, **332**, 120-127 (2012).
35. D.R. Delgado, F. Martínez. Solution thermodynamics of sulfadiazine in some ethanol + water mixtures, *J. Mol. Liq.*, **187**, 99-105 (2013).
36. D.R. Delgado, F. Martínez. Solubility and solution thermodynamics of some sulfonamides in 1-propanol + water mixtures, *J. Solution Chem.*, **43**, 836-852 (2014).
37. E.A. Cantillo, D.R. Delgado, F. Martínez, Solution thermodynamics of indomethacin in ethanol + propylene glycol mixtures, *J. Mol. Liq.*, **181**, 62-67 (2013).
38. D.R. Delgado, F. Martínez, Preferential solvation of sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in ethanol + water solvent mixtures according to the IKBI method, *J. Mol. Liq.*, **193**, 152-159 (2014).
39. D.M. Jiménez, Z.J. Cárdenas, D.R. Delgado, F. Martínez, A. Jouyban, Preferential solvation of methocarbamol in aqueous binary cosolvent mixtures at 298.15 K, *Phys. Chem. Liq.*, **52**, 726-737 (2014).
40. J. Jiménez, J. Manrique, F. Martínez, Effect of temperature on some volumetric properties for ethanol+ water mixtures, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **33**, 145-155 (2004).

41. M.J. Kamlet, R.W. Taft, The solvatochromic comparison method. I. The beta-scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 377-383 (1976).
42. R.W. Taft, M.J. Kamlet, The solvatochromic comparison method. II. The alpha-scale of solvent hydrogen-bond donor (hba) acidities, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 2886-2894 (1976).
43. F. Martínez, A. Jouyban, W.E. Acree Jr., Further numerical analysis on the solubility of ibrutinib in ethanol + water mixtures at different temperatures, *J. Mol. Liq.*, **218**, 35-38 (2016).
44. A. Jouyban, F. Martínez, W.E. Acree Jr., Comments on “Solubility and solution thermodynamics of 2,3,4,5-tetrabromothiophene in (ethanol + trichloromethane) binary solvent mixtures”, *Fluid Phase Equilib.*, **421**, 88-92 (2016)..

HOW TO CITE THIS ARTICLE

J.J. Sandoval-Castro, C.P. Ortiz, J.D. Rodríguez-Rubiano, G.A. Rodríguez-Rodríguez, D.R. Delgado, Preferential solvation of triclin in {ethanol (1) + water (2)} mixtures at several temperatures, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(2), 135-149 (2018).

Percepción de usuarios de Cali-Colombia acerca de medicamentos genéricos

Camilo Torres Serna^{1*}, David Altman Salcedo¹, Luisa María Fernández Rodríguez¹,
Luis Orozco Idrobo¹, Rodrigo A. Rosero Alayón¹

¹ Escuela de Medicina, Universidad Libre, seccional Cali, diagonal 37A No. 3-29, Santiago de Cali, Colombia.

* Correo electrónico: catorse@yahoo.com.

Recibido para evaluación: 23 de agosto de 2017

Aceptado para publicación: 23 de febrero de 2018

RESUMEN

En la población en general existe gran controversia alrededor del uso de medicamentos innovadores y de sus copias llamadas medicamentos genéricos. El objetivo de este estudio es cuantificar la aceptación de los pacientes, del Sistema General de Seguridad Social en Salud de Colombia (SGSSS) a la prescripción de medicamentos genéricos.

Se realizó un estudio de tipo descriptivo con un diseño transversal en 63 hombres y 57 mujeres, todos adultos pacientes que asistieron a consulta externa de los sitios de práctica de una Facultad de Medicina de Cali-Colombia.

Se concluye que si se usan medicamentos genéricos, se requiere que los médicos y los usuarios tengan confianza en él. Los resultados del presente estudio muestran que, aunque no en forma mayoritaria, todavía un porcentaje importante de los consumidores entrevistados dudan de la calidad y de los resultados terapéuticos de los genéricos. De manera preocupante, casi una cuarta parte de los participantes en el estudio piensa que los medicamentos genéricos son productos fraudulentos.

Palabras clave: prescripción de medicamentos, medicamentos genéricos, medicamentos innovadores, medicamentos fraudulentos.

SUMMARY

Perception of users of Cali-Colombia about generic medicines

In the general population, there is a great controversy surrounding the use of innovative drugs and their copies called generic drugs. The objective of this study is to quantify the acceptance of patients from the General System of Social Security in Health of Colombia (SGSSS) to the prescription of generic drugs.

A descriptive study was carried out with a transversal design. The universe was 63 men and 57 women, all adult patients who attended external consultation of the practice sites of the Faculty of Medicine of Cali-Colombia.

It is concluded that if generic drugs are used, it is necessary that doctors and users have confidence in it, the results of the present study show that, although not in the majority, still a significant percentage of the consumers interviewed doubt the quality and the therapeutic results of generics. Worryingly, nearly a quarter of study participants think that generic drugs are fraudulent products.

Key words: Prescription drugs, generic drugs, innovative drugs, fraudulent drugs.

INTRODUCCIÓN

El uso de medicamentos es la mayor estrategia terapéutica que utiliza el ser humano. Es la intervención médica más frecuente y la más documentada.

La preferencia por los medicamentos es, además, un rasgo cultural clave en la relación médico-paciente, pues tiene un enorme efecto simbólico, a tal punto que incluso puede distraer los problemas reales de la salud. La insatisfacción de los pacientes cuando en la consulta médica no se les prescribe algún medicamento, casi siempre es muy grande, se sienten desahuciados o hasta estafados [1].

Se conoce como medicamento genérico aquel que es técnicamente igual al medicamento innovador o primer medicamento investigado con esa composición química. Un laboratorio investigador desarrolla una molécula innovadora con usos terapéuticos, e inicia su comercialización con una marca registrada. Esta nueva molécula tiene reserva o patente de propiedad intelectual durante veinte años; posteriormente, otros laboratorios empiezan a fabricar la misma molécula y a comercializarla con la denominación común internacional (DCI) o con otras marcas. Estos productos, con la misma composición, son los que deben denominarse “productos genéricos” [2].

En la población en general existe gran controversia alrededor del uso de medicamentos innovadores y de sus copias llamadas medicamentos genéricos [3]. Las entidades de salud prefieren comprar productos genéricos la mayoría de las veces por ser más económicos [4], pero ¿qué tanto los pacientes desconfían de los productos genéricos? ¿Es opinión de unos pocos que lo enfatizan o es opinión de muchos? El objetivo de este estudio es cuantificar la aceptación de los pacientes del Sistema General de Seguridad Social en Salud de Colombia (SGSSS) a la prescripción de medicamentos genéricos. Se realizan estudios similares para cuantificar esta opinión también en dispensadores de medicamentos (droguistas) y en médicos.

METODOLOGÍA

Se llevó a cabo un estudio de tipo descriptivo observacional con un diseño transversal. El instrumento recolector de datos se basa en un cuestionario mixto denominado por sus siglas PAMPEFG-01 (percepción y actuación de médicos en la prescripción de especialidades farmacéuticas genéricas), validado y utilizado por García *et al.* [5] y adaptado para este estudio en pacientes usuarios del SGSSS (véase formulario anexo).

Este estudio se aplicó en todos los pacientes que asistieron a consulta externa de los sitios de práctica de la Facultad de Medicina de la Universidad Libre en Cali-Colombia. Mediante el *software* calculador de muestra (Rotator Survey), se obtuvo que la muestra debiera ser de 120 pacientes, los cuales se seleccionaron de manera probabilística el día escogido para recoger la información.

Esta investigación forma parte de un macroproyecto acerca del uso social del medicamento que realiza el grupo Gestión en Salud del programa de Gerencia en Salud de la Universidad Libre. Las personas participantes en el estudio tuvieron información de la finalidad de la investigación y fueron invitados a participar voluntariamente y mediante consentimiento informado. Según las normas y estándares del Ministerio de Salud de Colombia, esta investigación fue considerada sin riesgo, porque no se realizó ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos participantes en el estudio; también se elaboró un cuestionario en el que no se identificó al sujeto participante, no se solicitaron datos personales ni se involucraron aspectos sensitivos de su conducta. El comité de evaluación ética y científica para la investigación en seres humanos de la Universidad Libre de Cali aprobó la realización de este estudio mediante el Acta 5 de 2016.

RESULTADOS

El grupo de pacientes-usuarios estuvo conformado por 63 hombres y 57 mujeres, todos adultos. La distribución por edades se muestra en la tabla 1 y la distribución por escolaridad en la tabla 2.

Tabla 1. Distribución por edad y género de pacientes participantes en el estudio de percepción acerca de los medicamentos genéricos. Cali, Colombia.

Edad	Hombres	Mujeres	Total
20-29	12	12	24
30-39	15	13	28
40-49	15	17	32
50-59	10	4	14
60-69	5	6	11
70 y +	6	5	11
Totales	63	57	120

Tabla 2. Escolaridad de pacientes participantes en el estudio de percepción acerca de los medicamentos genéricos. Cali, Colombia.

Nivel de estudios	N
Primaria	15
Secundaria	33
Técnica	32
Profesional	40
Total	120

Los resultados de la encuesta realizada se presentan agrupando las respuestas en acuerdo y desacuerdo a las proposiciones planteadas y se analizan según tres aspectos:

1. Conocimiento del tema de genéricos por los encuestados. Para esta parte se consideran las respuestas dadas a las preguntas presentadas en la tabla 3.

Tabla 3. Pacientes de acuerdo o en desacuerdo con la proposición planteada, relacionada con el conocimiento del concepto de medicamento genérico.

Proposición planteada	En desacuerdo (%)	De acuerdo (%)
Normalmente me recetan medicamentos genéricos	20,8	72,5
Los medicamentos del POS solo pueden ser genéricos	55,0	37,5
Los genéricos deben ser esencialmente similares al medicamento original de referencia	21,7	65,8
Los medicamentos esenciales y medicamentos genéricos son la misma cosa	70,0	22,5
Los genéricos son equivalentes a los no genéricos	44,2	23,3

2. Opinión personal de los medicamentos genéricos de los encuestados. Para esta parte se consideran las respuestas dadas a las preguntas presentadas en la tabla 4.

Tabla 4. Pacientes de acuerdo o en desacuerdo con la opinión planteada, acerca de los medicamentos genéricos.

Proposición planteada	En desacuerdo (%)	De acuerdo (%)
Los genéricos consiguen el mismo efecto clínico que los medicamentos no genéricos	56,7	29,2
Generalmente los genéricos no cumplen con el efecto terapéutico (tratamientos fallidos)	41,7	37,5
Los genéricos ofrecen las mismas garantías de calidad del preparado por una marca comercial	59,2	25,0
Los pacientes valoran poco los genéricos	26,7	59,2
El uso de los genéricos aumenta el riesgo de efectos indeseables	32,5	39,2
Los genéricos deben usarse en sustitución de los medicamentos de patente por su bajo costo	41,7	41,7

3. Opinión del contexto del uso de los genéricos. Aquí se agrupan las preguntas relacionadas a lo que piensan los usuarios encuestados de médicos, droguistas y de los laboratorios fabricantes. Las respuestas se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Pacientes de acuerdo o en desacuerdo con la proposición planteada, relacionada con el entorno del uso de medicamentos genéricos.

Proposición planteada	En desacuerdo (%)	De acuerdo (%)
El uso de los genéricos restringe la capacidad de elección del médico para recetar medicamentos	30,0	55,0
Los médicos suelen obtener regalos o premios por recetar medicamentos comerciales	15,0	52,5
La prescripción de los genéricos disminuye el gasto farmacéutico al sistema de salud	15,0	75,0
Se duda de la calidad de los laboratorios que fabrican los genéricos	31,7	38,3
El uso de los genéricos limita la creación e investigación de nuevos medicamentos	46,7	36,7
La mayoría de los genéricos que existen en el mercado son piratas (copia ilegal)	38,3	24,2
En la droguería se prioriza la oferta de los genéricos	42,5	46,7

DISCUSIÓN

Como era de esperarse, los pacientes encuestados frecuentemente (72,5%) reciben medicamentos genéricos en sus prescripciones (figura 1) y consideran (55%) que el Plan Obligatorio de Salud (POS) solo puede suministrar genéricos.

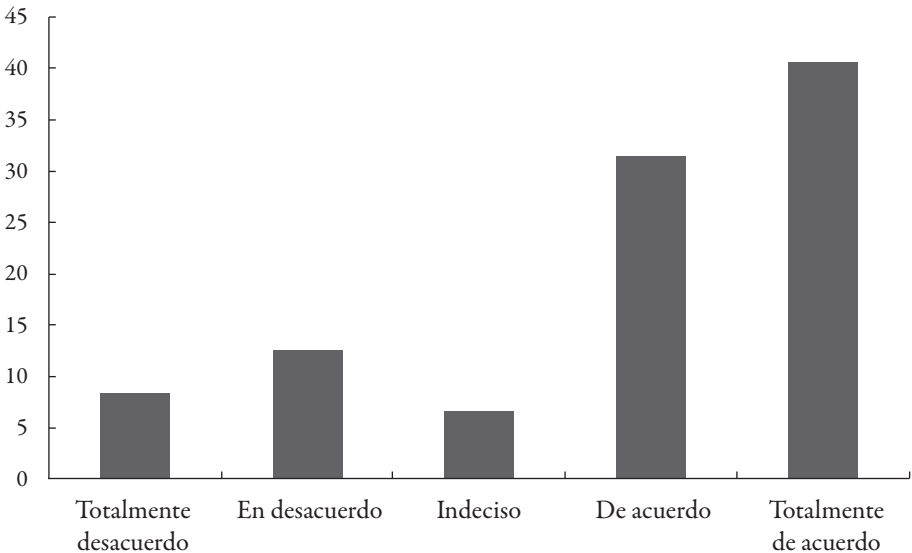


Figura 1. Los pacientes consideran que normalmente le recetan medicamentos genéricos.

A pesar de que los participantes en el estudio creen que los genéricos ofrecen las mismas garantías de calidad que una marca comercial (figura 2), el 60% de los pacientes los valoran poco (figura 3) y consideran que el uso de los genéricos restringe la capacidad de elección del médico para recetar medicamentos (figura 4) y disminuye el gasto farmacéutico del sistema de salud (figura 5).

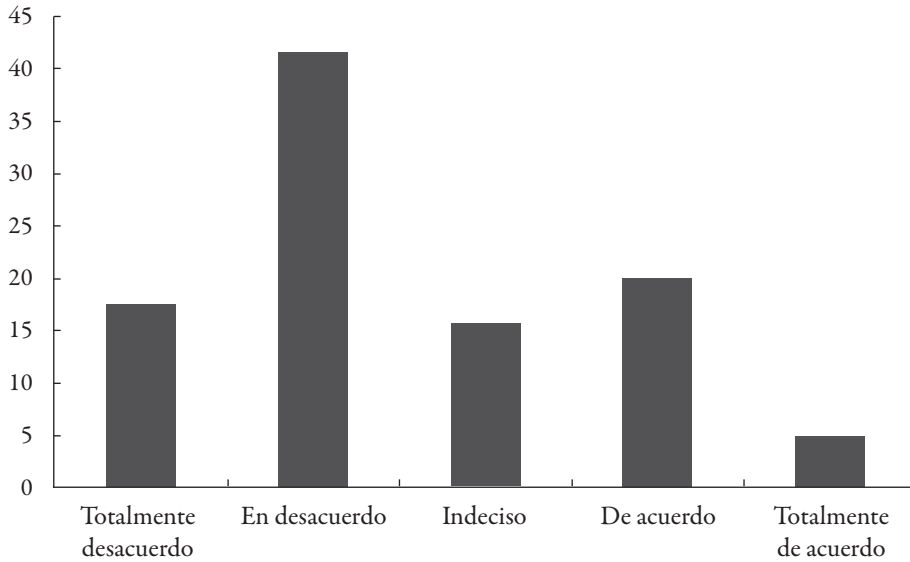


Figura 2. Los genéricos ofrecen las mismas garantías de calidad del preparado por una marca comercial.

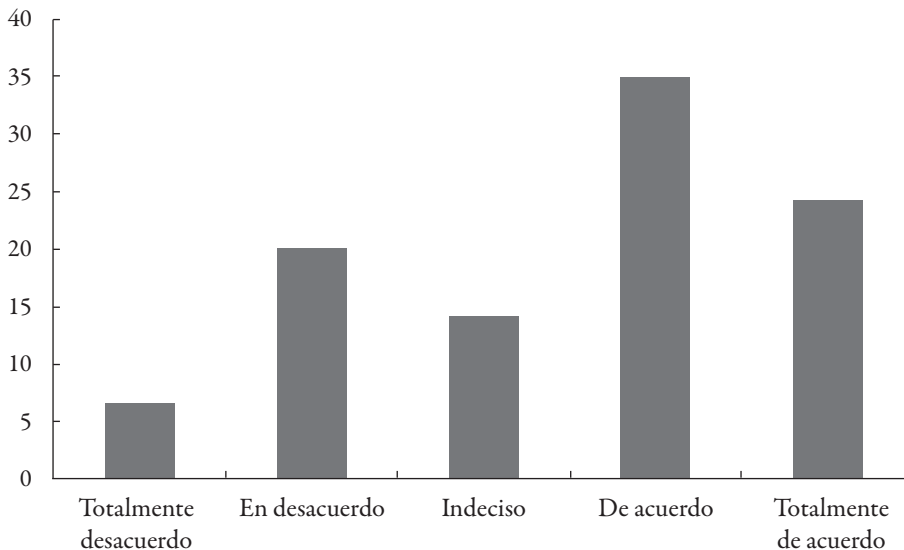


Figura 3. Los pacientes valoran poco los genéricos.

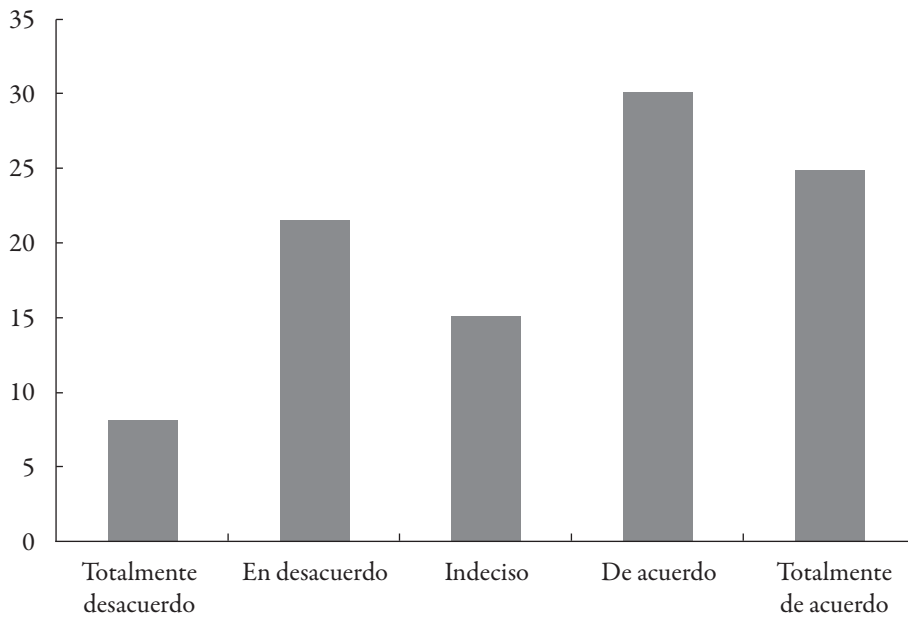


Figura 4. El uso de los genéricos restringe la capacidad de elección del médico para recetar medicamentos.

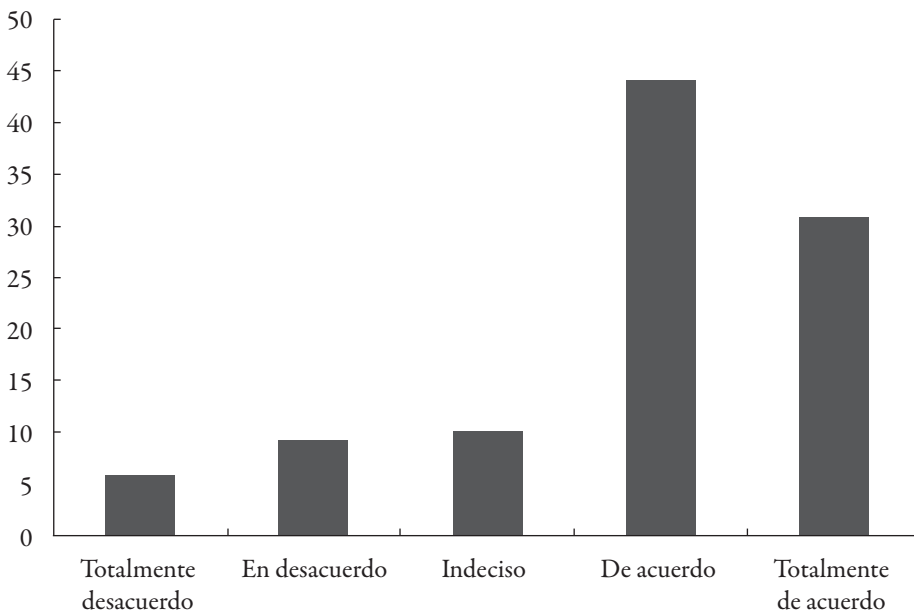


Figura 5. La prescripción de los genéricos disminuye el gasto farmacéutico al sistema de salud.

El 37,5% de los participantes considera que los genéricos no cumplen con el efecto terapéutico (tratamientos fallidos), pero el 41,7% considera que sí lo cumple (figura 6). De manera similar, el 39,5% de los usuarios considera que el uso de los genéricos aumenta el riesgo de efectos indeseables y el 32,5% no lo considera (figura 7).

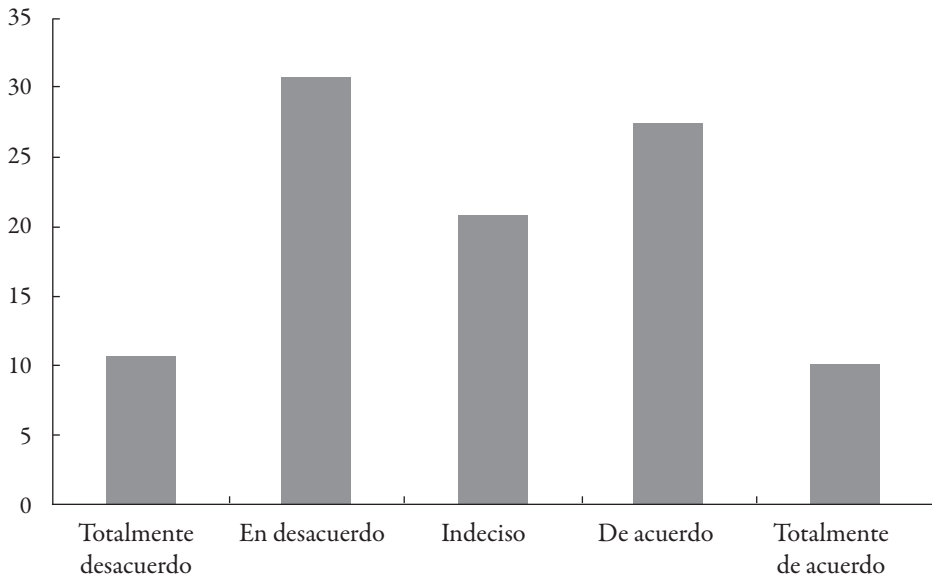


Figura 6. Generalmente, los genéricos no cumplen con el efecto terapéutico (tratamientos fallidos).

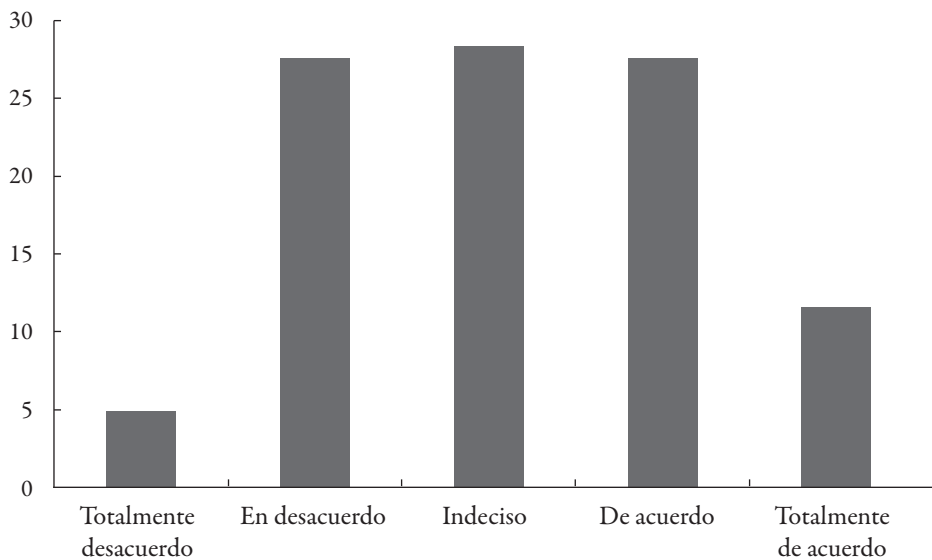


Figura 7. El uso de los genéricos aumenta el riesgo de los efectos indeseables.

La principal ventaja de un medicamento genérico frente a un medicamento innovador es el menor costo de fabricación, ya que el genérico no requiere inversión en investigación, ni en promoción, pero eso no implica que sea un producto de baja calidad.

Los productos farmacéuticos genéricos existen en todo el mundo, se comercializan con DCI y con marca secundaria diferente a la marca pionera [6]. Otras denominaciones que se utilizan para referirse a los productos genéricos son: producto competidor (en Argentina, Ecuador), producto similar (en México), genérico intercambiable (GI) (en México). La Organización Mundial de la Salud (OMS) los llama medicamentos multifuente o de fuentes múltiples [7].

La evidencia científica muestra que los genéricos funcionan tan bien como los medicamentos de marca [8], pero es frecuente escuchar comentarios sobre la mala calidad de los medicamentos genéricos. La Federación Médica Colombiana plantea siete verdades sobre medicamentos genéricos en Colombia y entre ellas destaca:

[...]gracias a una intensa y continuada actividad propagandística y publicitaria, entre los colombianos se ha creado una imagen que identifica a los medicamentos genéricos con mala calidad. Aprovechando la existencia de algunas imperfecciones en las normas sobre la calidad de estos medicamentos, y gracias a observaciones empíricas anecdóticas hechas sin suficiente evidencia científica, algunos sectores de la industria farmacéutica tienen claras razones de mercado para difundir la imagen de mala calidad de los genéricos [9].

La calidad de los medicamentos es vigilada y se exige las denominadas “buenas prácticas de manufactura” (BPM), para garantizar una producción que siga los parámetros verificables. Todo medicamento, sea genérico o de marca, sea pionero o competidor, debe ajustarse a los mismos estándares. Para el Invima no existen diferencias y muchas investigaciones lo sustentan; pero no se puede impedir que los laboratorios farmacéuticos inviertan en publicidad para promocionar la idea de que las diferencias de precio reflejen diferencias en calidad, y el terreno para esta información negativa sobre los genéricos es fácil, pues los pacientes son reacios a aceptar que dos cosas que pueden tener grandes diferencias en su precio, no signifiquen diferencias en calidad [13].

Los resultados del presente estudio muestran que buena parte de los participantes tienen un conocimiento adecuado de los medicamentos genéricos; el 70% identifica que los medicamentos esenciales y medicamentos genéricos no son la misma cosa, pero todavía una cuarta parte de los participantes (24,2%) confunde los productos genéricos con productos fraudulentos (piratas). El 55% sabe que los medicamentos del Plan Obligatorio de Salud (POS) no tienen que ser necesariamente genéricos. La mayoría reconoce que los genéricos son equivalentes a los no genéricos (44,2%), que deben ser

esencialmente similares al medicamento original de referencia (65,8%) y que es posible obtener el mismo efecto clínico con un genérico que con un medicamento no genérico (56,7%). Pero el número de consumidores que aún muestra dudas sobre la calidad de los genéricos, todavía debe preocupar.

Dos resultados son preocupantes, y podrían resumir el pensamiento de los consumidores: el primero, el 56,7% de los consumidores consideran que los genéricos no consiguen el mismo efecto clínico que los medicamentos no genéricos (figura 8). El segundo, de igual manera, más de la mitad de los pacientes (52,5%) consideraron que los médicos suelen obtener regalos o premios por recetar medicamentos comerciales (figura 9).

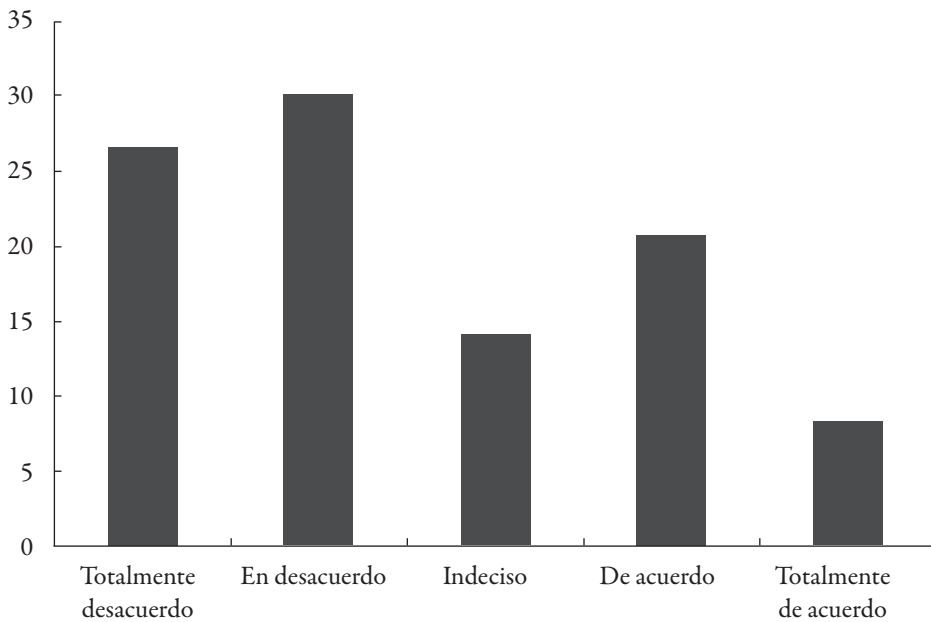


Figura 8. Los genéricos consiguen el mismo efecto clínico que los medicamentos no genéricos.

Además, otro factor para tener en cuenta: no se deben confundir los medicamentos genéricos con medicamentos ilegales, sean falsificados o adulterados. El 24% de los participantes en este estudio, consideran que los genéricos son productos ilegales y solo el 38,3% los considera productos diferentes de los productos ilegales o mal llamados “piratas” (tabla 5).

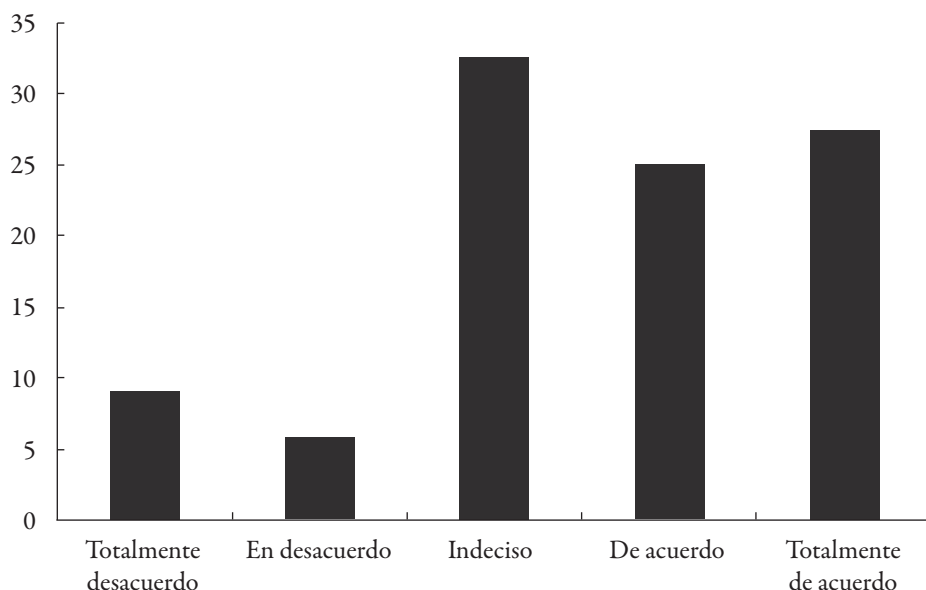


Figura 9. Los médicos suelen obtener regalos o premios por recetar medicamentos comerciales.

Son medicamentos falsificados aquellos que no contienen el principio activo que dicen contener. Se han detectado medicamentos que no contienen ningún principio activo y otros que tienen principios activos diferentes, incluso tóxicos. Según la OMS [14], el 8% de los fármacos que se expenden en el mundo son falsos. De este 8%, el 50% no contienen ningún ingrediente activo o contienen uno equivocado. El 10% son sustancias contaminantes. La adulteración más frecuente de medicamentos es la de modificar las fechas de vencimiento de productos ya vencidos, pero también se encuentran medicamentos a los cuales se les ha disminuido la concentración del principio activo (por ejemplo, una cápsula de 500 mg que solo contiene 200 o 300 mg). Los medicamentos genéricos son productos legales con vigilancia y control de su manufactura; además, paradójicamente, son los menos falsificados o adulterados por una razón simple: son baratos y los antisociales van a preferir falsificar o adulterar productos costosos que les representen mayores ganancias.

La prescripción genérica viene aumentando constantemente en todo el mundo [15,16]. Por ejemplo, la proporción de recetas escritas en la práctica general en Inglaterra con el nombre genérico aumentó del 35% en 1985 al 55% en 1995. Cuando un producto se prescribe genéricamente, las alternativas que se pueden suministrar deben ser equivalentes [18,19], para garantizar que no se pone en riesgo la vida de los pacientes; es usual que los médicos tengan temor de que esa equivalencia no exista, pero la evidencia de

una adecuada equivalencia cuando se cumplen buenas prácticas de manufactura es muy grande [20, 21, 22, 23].

Una manera de crear confianza al consumidor, es identificando claramente los genéricos aprobados por la oficina regulatoria [24, 25, 26]; por ejemplo, en Chile los medicamentos genéricos que cumplan con bioequivalencia, deben llevar una franja amarilla que los identifique. En México se agrega la sigla GI (genérico intercambiable), y en España se agrega la sigla EFG (especialidad farmacéutica genérica).

Estos hallazgos subrayan el desafío que enfrentan los proveedores, las aseguradoras y los formuladores de políticas para estimular el uso rentable de los medicamentos [27, 28].

CONCLUSIONES

Si se emplean medicamentos genéricos, se requiere que los médicos y usuarios confíen en los genéricos. Los resultados del presente estudio muestran que, aunque no en forma mayoritaria, todavía un porcentaje importante de los consumidores entrevistados dudan de la calidad y de los resultados terapéuticos de los genéricos. De manera preocupante, casi una cuarta parte de los participantes en el estudio piensa que los medicamentos genéricos son productos fraudulentos.

El Estado y todos los eslabones de la cadena de suministro de medicamentos deben trabajar más el proceso educativo de toda la comunidad y enfrentar la promoción negativa que otros intentan hacer del medicamento genérico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto de Investigaciones Biomédicas, Grupo de investigación de la Universidad Libre de Cali (Categoría A de Colciencias) el apoyo logístico suministrado para llevar a cabo este trabajo.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés en la realización de este trabajo. No tienen vínculos directos, ni indirectos, con la industria farmacéutica.

REFERENCIAS

1. V.H. Bolaños, R. D'Alessio, E. Fefer, K. de Joncheere, E. Holzhauser de Uzcátegui, "Armonización de la reglamentación farmacéutica en América Latina", Organización Panamericana de la Salud, Washington, D. C., 1996.
2. A.J. McLachlan, Frequently asked questions about generic medicines, *Austr. Prescriber*, **30**, 41-43 (2007).
3. OMS, "Medicamentos esenciales", Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 2007
4. D.P. Goldman, G.F. Joyce, Y. Zheng, Prescription drug cost sharing, *JAMA*, **298**(1), 61-69 (2007).
5. A.J. García, F. Martos, F. Leiva, F. Sánchez de la Cuesta, Genéricos: ¿buenos o malos? Conocimientos y actitudes de los médicos ante los medicamentos genéricos, *Gaceta Sanit.*, **17**, 144-149 (2003).
6. G. Velásquez, P. Pascale, "Globalización y acceso a los medicamentos: perspectivas sobre el acuerdo ADPIC/OMC", 2ª ed., Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 2000.
7. World Health Organization, "Action Programme on Essential Drugs", Global comparative pharmaceutical expenditures, Geneva, 1997.
8. Mitos y verdades sobre medicamentos genéricos, 2009, URL: <http://www.redsaf.org/index.php?pag=noticiadetalle&id=507>, consultado en junio de 2017.
9. S. Isaza, Siete verdades sobre medicamentos genéricos en Colombia. Primer foro nacional "La verdad sobre los medicamentos genéricos", Bogotá, 2009, URL: http://colegiomedico.cundibogota.googlepages.com/FMC_PonenciaSena-do21abr09FINAL.doc, consultado en junio de 2017.
10. L. Hendeles, G. Hochhaus, S. Kazerounian, Generic and alternative brand-name pharmaceutical equivalents, *Am. J. Hosp. Pharm.*, **50**(2), 323-329 (1993).
11. J.E. Murphy, Generic substitution and optimal patient care, *Arch. Intern. Med.*, **159**(5), 429-433 (1999).
12. P. Meredith, Bioequivalence and other unresolved issues in generic drug substitution, *Clin. Ther.*, **25**(11), 2875-2890 (2003).
13. M.D. Vásquez-Serrano, M.E. Cortés-Gamba, F. Rossi-Buenaventura, Efectos de las marcas comerciales en medicamentos, Ifarma, Bogotá, 2011.

14. OMS, "Medicamentos falsificados - Pautas para la formulación de medidas para combatir los medicamentos falsificados", World Health Organization, Ginebra, 1999.
15. P.A. Meredith, Generic drugs: Therapeutic equivalence, *Drug Saf.*, **15**(4), 233-242 (1996).
16. M.C. Meyer, Generic drug product equivalence, *Am. J. Manag. Care*, **4**(8), 1183-1192 (1998).
17. J.A. Pereira, A.M. Holbrook, L. Dolovich *et al.*, Are brand-name and generic warfarin interchangeable? *Ann. Pharmacother.*, **39**(7-8), 1188-1193 (2005).
18. R.K. Verbeeck, I. Kanfer, R.B. Walker, Generic substitution: The use of medicinal products containing different salts and implications for safety and efficacy, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **28**(1-2), 1-6 (2006).
19. D. Bhosle, A. Sayyed, A. Bhagat, H. Shaikh, A. Sheikh, V. Bhopale, Z. Quazi, Comparison of generic and branded drugs on cost effective and cost benefit analysis, *Ann. Int. Med. Dental Res.*, **3**(1), 35-37 (2016).
20. Consumers' Association, Generic medicines: Can quality be assured? *Drug Ther. Bull.*, **35**(2), 9-11 (1997).
21. C. Gaither, D. Kirking, F. Ascione, L. Welage, Consumers' views on generic medications, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **41**, 729-736 (2001).
22. A.S. Al-Jazairi, S. Bhareth, I.S. Eqtefan, S.A. Al-Suwayeh, Brand and generic medications: Are they interchangeable? *Ann. Saudi Med.*, **28**(1), 33-41 (2008).
23. B.N. Davit, P.E. Nwakama, G.J. Buehler, D.P. Conner, S.H. Haidar, D.T. Patel, Y. Yang, L.X. Yu, J. Woodcock, Comparing generic and innovator drugs: A review of 12 years of bioequivalence data from the United States Food and Drug Administration, *Ann. Pharmacother.*, **43**(10), 1583-1597 (2009).
24. A.S. Kesselheim, A. Misono, J.L. Lee, M.L. Stedman, A. Brookhart, N.K. Choudhry, W.H. Shrank, Clinical equivalence of generic and brand-name drugs used in cardiovascular disease. A systematic review and meta-analysis, *JAMA*, **300**(21), 2514-2526 (2008).
25. M.A. Fischer, J. Avorn, Potential savings from increased use of generic drugs in the elderly, *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, **13**(4), 207-214 (2004).
26. R.T. Calvert, Bioequivalence and generic prescribing, *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**(1), 9-10 (1996).

27. W.H. Shrank, E.R. Cox, M.A. Fischer, J. Mehta, N.K. Choudhry, Patients' perceptions of generic medications, *Health Aff. (Millwood)*, **28**(2), 546-556 (2009).
28. B.L. Strom, Generic drug substitution revisited, *New Engl. J. Med.*, **316**(23), 1456-1462 (1987).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

C. Torres-Serna, D. Altman-Salcedo, L.M. Fernández-Rodríguez, L. Orozco-Idrobo, R.A. Rosero-Alayón, Percepción de usuarios de Cali-Colombia acerca de medicamentos genéricos, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(2), 151-168 (2018).

ANEXO

Formulario usado para recolectar la información*

MERCADO DE GENÉRICOS. LA PERSPECTIVA DEL USUARIO/PACIENTE

(Percepción y actuación de los usuarios/pacientes y los factores intervinientes en el uso de medicamentos genéricos)

La Facultad de Medicina de la Universidad Libre, seccional de Cali, actualmente realiza una investigación sobre el consumo de medicamentos genéricos en Cali. La información que usted nos proporcione será usada con fines académicos, de antemano agradecemos su valiosa colaboración y le garantizamos un completo anonimato y absoluta confidencialidad.

Instrucciones: marque con una X la opción de respuesta que considere correcta y complemente los datos faltantes.

1	Edad:		
2	Género	Masculino	Femenino
3	Formación académica	Primaria	
		Secundaria	
		Técnica/lógica	
		Profesional	

(Continúa)

Formulario usado para recolectar la información* (*Continuación*)

Instrucciones: marque con una X la opción de respuesta que considere correcta y complemente los datos faltantes.

		1	2	3	4	5
	Pregunta	Totalmente desacuerdo	En desacuerdo	Indeciso	De acuerdo	Totalmente de acuerdo
5	Medicamentos esenciales y medicamentos genéricos son la misma cosa					
6	Los medicamentos del POS solo pueden ser genéricos					
7	Los genéricos son equivalentes a los no genéricos					
8	Los genéricos consiguen el mismo efecto clínico que los medicamentos no genéricos					
9	Generalmente los genéricos no cumplen con el efecto terapéutico (tratamientos fallidos)					
10	El uso de los genéricos aumentan el riesgo de efectos indeseables					
11	Los genéricos debe ser esencialmente similares al medicamento original de referencia					
12	Los genéricos ofrecen las mismas garantías de calidad del preparado por una marca comercial					
13	La prescripción de los genéricos disminuye el gasto farmacéutico a sistema de salud					

(*Continúa*)

Formulario usado para recolectar la información* (*Continuación*)

Instrucciones: marque con una X la opción de respuesta que considere correcta y complemente los datos faltantes.

14	Los genéricos deben usarse en sustitución de los medicamentos de patente por su bajo costo					
15	Normalmente me recetan medicamentos genéricos					
16	En la droguería se prioriza la oferta de los genéricos					
17	El uso de los genéricos restringe la capacidad de elección del médico para recetar medicamentos					
18	Los médicos suelen obtener regalos o premios por recetar medicamentos comerciales					
19	Se duda de la calidad de los laboratorios que fabrican los genéricos					
20	La mayoría de los genéricos que existen en el mercado son piratas (copia ilegal)					
21	El uso de los genéricos limita la creación e investigación de nuevos medicamentos					
22	Los pacientes valoran poco los genéricos					
23	Mencione 5 genéricos a los cuales les tenga confianza:					

* Adaptado de A.J. García, F. Martos, F. Leiva, F. Sánchez de la Cuesta, *Gaceta Sanit.*, 17, 144-149 (2003).

Evaluación de la publicidad de medicamentos y suplementos dietarios en un canal de televisión dentro de la franja horaria central

Angélica Andrea González-Acuña¹, Laura Dennis Vargas-Zapata¹, José Julián López-Gutiérrez^{1*}

¹ Universidad Nacional de Colombia, Campus Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Grupo de investigación: Red para el uso adecuado de medicamentos (RAM), Ciudad Universitaria, Cra. 30 No. 45-03, Bogotá, D. C., Colombia.

* Correo electrónico: : jjlopezg@unal.edu.co.

Recibido para evaluación: 25 de septiembre de 2017

Aceptado para publicación: 2 de marzo de 2018

RESUMEN

Introducción: la publicidad de medicamentos y suplementos dietarios en televisión tiene un impacto directo en los patrones de consumo y la salud pública de la población, por lo que se requiere cuantificar la frecuencia de la publicidad de los medicamentos y suplementos dietarios y evaluar su contenido respecto a la normativa nacional e internacional.

Metodología: se grabó toda publicidad relacionada con medicamentos y suplementos dietarios emitida durante la franja familiar en un canal de televisión nacional. Se cuantificó la frecuencia, tiempo de duración total y se evaluó el cumplimiento de los requerimientos del ente regulador de medicamentos (Invima), la Superintendencia de Industria y Comercio (SIC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Resultados: el tiempo de duración de los anuncios comerciales durante la transmisión de la franja familiar fue de 237,4 minutos. El 9,8% correspondió a medicamentos y el 0,8% a suplementos dietarios. Se identificó el incumplimiento en algunos criterios establecidos por el Invima y la OMS, además de cinco anuncios bajo supervisión de la SIC por publicidad engañosa.

Conclusiones: hay mayor proporción en la emisión de anuncios de medicamentos que de suplementos dietarios. Existe un porcentaje importante de no conformidad de los requerimientos del Invima y de la OMS.

Palabras clave: publicidad de medicamentos, televisión, suplementos dietéticos, OMS.

SUMMARY

Evaluation of advertising of drugs and dietary supplements on a television channel within the main time band

Introduction: the advertising of drugs and dietary supplements on television has a direct impact on the consumption patterns and the public health of the population, thus establishing the need to quantify the frequency of advertising of drugs and dietary supplements and additionally assess the content of the advertising regarding the current regulations of Invima, WHO and SIC.

Methodology: during the week of June 27 to July 3, 2016 on a national television channel there were recorded all advertising related to drugs and dietary supplements broadcasted during the family strip from 7:00-21:30. 37 drug advertisements and 4 dietary supplement advertisements were analyzed, and frequency and total duration time were quantified. In addition, a checklist type matrix was used to evaluate compliance with the requirements of the Invima and WHO ethical criteria (only for drug commercials), to subsequently determine the percentage of compliance and non-compliance of each requirement.

Results: it was obtained that during the study week the average duration of advertising space during the transmission of the family band was 237.4 minutes, equivalent to approximately 4 hours; and that the proportion of these advertising spaces spread in advertisements of drugs and dietary supplements, corresponded on average to 9.8% to advertisements for drugs and 0.8% to advertisements for dietary supplements. Non-compliance was identified with both the Invima requirements and the WHO ethical criteria, and finally five advertisements of drugs that were under supervision of the SIC by misleading advertising.

Conclusions: it was possible to quantify the length of time spent in drug commercials and dietary supplements in relation to the total time of emission of the family band, evidencing a greater proportion in the advertisement of drugs than of dietary supplements

Key words: Drug publicity, television, dietary supplements, WHO.

INTRODUCCIÓN

La televisión es un medio de comunicación masivo que a lo largo de la historia ha desarrollado un papel importante cultural, social, económica y políticamente en cualquier sociedad. Además de poseer diferentes funciones, una de las principales es la informativa dentro de la cual se encuentra implícita la persuasión hacia los televidentes [1]. Una de las expresiones de esta persuasión es la publicidad, la cual se constituye como una de sus principales fuentes de financiación. Debido a esto, la industria, y en particular el sector farmacéutico, busca motivar al televidente a través de sus anuncios publicitarios empleando estrategias de posicionamiento basadas en la cultura del consumidor para adquirir sus productos, tales como medicamentos y suplementos dietarios [2]. Dentro de la cadena de valor del medicamento se encuentra el uso de estos, por lo que es necesario conocer sus indicaciones, contraindicaciones, dosis, número de días de tratamiento, efectos secundarios, costos, entre otros [3]. Estas condiciones son críticas para el uso apropiado de los medicamentos.

Actualmente en Colombia, solo se autoriza la publicidad en medios de comunicación masiva a aquellos medicamentos denominados de venta libre (OTC: *over the counter*) o sin prescripción médica, y también para los suplementos dietarios. Para estos productos, existen regulaciones que garantizan el cumplimiento de las normas sanitarias para que la información dirigida a los consumidores oriente su adquisición certera y uso responsable [4]. El Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima) es el ente regulador encargado de ejercer inspección, vigilancia y control sobre la forma de publicitar los medicamentos y suplementos dietarios en Colombia, mediante criterios establecidos por el Ministerio de Salud y Protección Social [5]. Asimismo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido criterios éticos para la publicidad y promoción de los medicamentos con el fin de velar por el uso racional de estos. En varios estudios se ha evidenciado que la industria farmacéutica, por medio de la publicidad, está empleando estrategias que inducen a la adquisición irracional incumpliendo con la normativa, lo cual pone en cuestionamiento la función realizada por los entes reguladores.

A pesar de esta regulación, en Colombia existen casos en los que la Superintendencia de Industria y Comercio (SIC) —entidad que tiene dentro de sus funciones la protección al consumidor— ha sancionado algunos anuncios comerciales (AC) por publicidad engañosa. Uno de ellos ha sido sancionado con una multa económica y, además, se le ordena retirar toda publicidad relacionada con algunos de los productos que comercializa [6, 7], pero a pesar de esto, aún cuentan con AC en circulación. Además, la publicidad emitida por el laboratorio NN, fue sometida a control previo por la SIC durante el tiempo en que se realizó la respectiva investigación.

La búsqueda en las bases de datos PUBMED, SCIENCE DIRECT y SCIELO identificó artículos relacionados con la publicidad en televisión y otros medios de comunicación masivos de medicamentos de venta con prescripción médica permitida actualmente en países como Estados Unidos y Nueva Zelanda. En la misma búsqueda, se identificaron otros estudios realizados en países donde está prohibida y solo es admitida para medicamentos OTC. Estas investigaciones evaluaron el impacto positivo o negativo de la publicidad de los medicamentos en los consumidores y el análisis de los AC en diferentes medios de comunicación de acuerdo con el cumplimiento de las regulaciones vigentes, según los países de origen del estudio. No se encontraron artículos dirigidos a la publicidad de suplementos dietarios exclusivamente.

La industria farmacéutica amplía cada día más el número de medicamentos de venta libre, con lo cual se incrementa la publicidad especialmente de analgésicos, antigripales, antitusivos, adelgazantes, antihistamínicos, antiácidos, antiinflamatorios, laxantes, relajantes musculares, y otros productos farmacéuticos como vitaminas, complementos alimenticios, entre otros. Dado que los medicamentos tienen impacto directo en la salud pública, se deben publicitar en condiciones de estricto rigor científico y ético, garantizando la información fiable. Sin embargo, algunas de las propagandas televisivas son engañosas, ya que omiten las precauciones, contraindicaciones y advertencias de los mismos, siendo emitidos por canales de televisión abierta y en horario central de preferencia donde se concentra la atención del grupo familiar, para así reforzar la percepción de sus marcas y garantizar efectos de recordación de sus productos [8].

En Colombia y en otros países como Corea del Sur, el ente regulador prohíbe la publicidad exagerada de los medicamentos y se estipula la evaluación antes de su difusión [9]. Un estudio realizado en Brasil evaluó la publicidad de medicamentos OTC y de prescripción médica en diferentes medios de comunicación. En este estudio, se encontró que el 74,73% de los anuncios no cumplió con la legislación vigente, pues además de atribuir propiedades superiores a los productos anunciados, recurría a diferentes estrategias publicitarias como la asociación de los productos con representaciones físicas, emocionales, intelectuales y de belleza para lograr su venta [10].

Un estudio sobre promoción de medicamentos y su grado de acatamiento reflejado en piezas publicitarias expuestas al público en Argentina, Colombia, Ecuador, Nicaragua y Perú, señala el riesgo de la promoción como inductora de consumo. Esto obedece a que en los anuncios publicitarios las indicaciones del medicamento son la información más frecuentemente incluida, en contraste con la ausencia de información relacionada con su seguridad. Circunstancia que podría limitar la evaluación del riesgo-beneficio global del producto al momento de tomar una decisión terapéutica, tanto por quien prescribe —en el caso de los medicamentos de venta con prescripción como por el consumidor, si se trata de medicamentos de venta libre— [11].

Los resultados de estudios realizados que evaluaron la publicidad en otros medios de comunicación distintos a la televisión, sugieren la necesidad de un sistema regulatorio efectivo y proactivo para asegurar que la información provista en la publicidad esté soportada en el buen uso de los medicamentos [12]. El ente regulador de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés: Food Drug Administration) ha elaborado guías con el objetivo de redefinir el marco regulatorio de la publicidad dirigida al consumidor (DTCA, por sus siglas en inglés) reforzando y refuerzan la necesidad de evaluar continuamente estas políticas para asegurar que la salud del paciente es promovida más allá de los intereses comerciales [13].

Por todo lo anterior, es necesario identificar los AC de medicamentos y suplementos dietarios en un canal de la televisión colombiana; evaluarlos frente a los criterios establecidos por el Invima, como también cuantificar el tiempo utilizado

METODOLOGÍA

Diseño

Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal con recolección prospectiva de la información. Se incluyó toda publicidad relacionada con medicamentos y suplementos dietarios emitida durante la franja familiar en el horario de 7:00 a.m. a 9:30 p.m. durante la semana del 27 de junio al 3 de julio de 2016 en un canal de televisión nacional abierto y de gran audiencia. Se incluyó toda la publicidad de medicamentos (homeopáticos, fitoterapéuticos y de síntesis química) y suplementos dietarios transmitida en el canal durante la franja familiar.

Materiales

Se recopiló la Resolución 4320 de 2004 sobre la publicidad de medicamentos en Colombia; las cartillas del Invima relacionadas con la publicidad de medicamentos y suplementos dietarios; el listado de medicamentos de venta libre OTC; la Ley 1480 de 2011 (Estatuto del Consumidor) bajo la cual actúa la SIC, y el código de ética proclamado por la OMS.

Los comerciales se grabaron con una cámara de video Nikon D3300, con el fin de ser analizados detalladamente en cuanto al contenido, y se empleó la aplicación cronómetro temporizador para determinar la frecuencia y tiempo de duración tanto de los espacios publicitarios como de cada comercial objeto de estudio. Esta información se consignó en una matriz creada en el programa informático, MS Excel® 2013.

Se elaboró una lista de verificación (Cumple o no cumple) para evaluar el cumplimiento de los requerimientos del Invima (AC de medicamentos y suplementos dietarios) y los criterios éticos de la OMS (solo para AC de medicamentos), para determinar el porcentaje de cumplimiento de cada requerimiento.

Plan de análisis

Se cuantificó el tiempo de duración total mediante la sumatoria de los tiempos de duración de cada comercial, con lo cual se determinó, para cada día de la semana de estudio, el porcentaje de AC de medicamentos y AC de suplementos dietarios con respecto al tiempo total empleado en espacios publicitarios durante la franja familiar.

RESULTADOS

Durante el período de estudio se emitieron 37 AC de medicamentos y 4 AC de suplementos dietarios. En la semana de estudio, el tiempo de duración promedio de los espacios publicitarios fue de 237,4 minutos (4 horas, aproximadamente), de los cuales el 9,8% (23/237) y el 0,8% (2/237) correspondieron a propagandas de medicamentos y suplementos dietarios, respectivamente. Hubo un descenso en la emisión de comerciales de medicamentos los días viernes y sábado por la promoción y transmisión de un evento deportivo (Tour de Francia). Este comportamiento puede verse en la figura 1. La mediana de AC/día de medicamentos fue de 80 y los más frecuentemente publicitados fueron el Advil® en sus diferentes presentaciones (69 veces/semana), el Tukol-D® (41 veces/semana) y el Medicasp® (40 veces/semana).

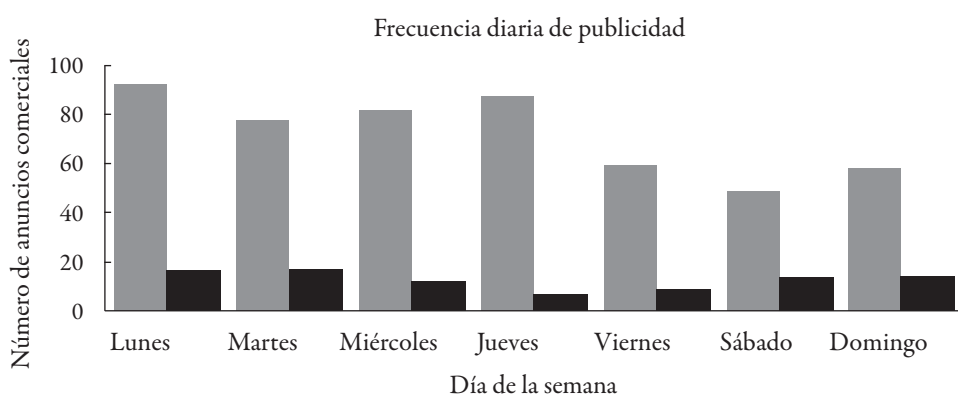


Figura 1. Número de anuncios comerciales de medicamentos y suplementos dietarios durante la emisión de la franja familiar por día de la semana.

Durante el período de estudio se emitió publicidad de 38 medicamentos, cuyos principios activos se encuentran en la tabla 1. La clasificación de estos medicamentos, según el nivel 1 del ATC (anatómico, terapéutico, químico), muestra que el sistema nervioso con 31,6% (12/38), respiratorio con 26,3% (10/38) y gastrointestinal con 21,1% (8/38), son los más frecuentemente publicitados. Otros resultados de interés se encuentran en la figura 2.

Tabla 1. Principios activos identificados en los AC de medicamentos.

Principios activos identificados
Acetaminofén / acetaminofén combinaciones
Ibuprofeno / ibuprofeno combinaciones
Ácido acetilsalicílico / combinaciones
Naproxeno / naproxeno combinaciones
Dextrometorfano combinaciones
Bromhexina combinaciones
Benzocaína combinaciones
Nistatina combinaciones
Ketoconazol
Clotrimazol
Bicarbonato de sodio
Diosmectita
Omeprazol
Hidrotalcita
Ispaghula
Dimenhidrinato
Multivitaminas
Electrolitos
Mentol
Carbonato de calcio combinaciones

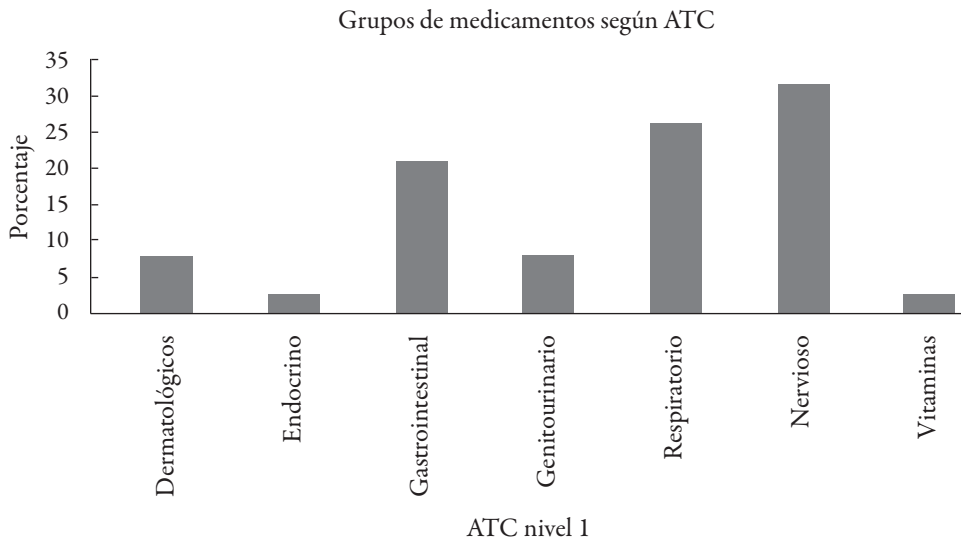


Figura 2. Frecuencia de grupos terapéuticos según el nivel 1 del ATC.

En cuanto al cumplimiento de los requerimientos del Invima de la publicidad de medicamentos (tabla 2), se encontró que el 100% de los anuncios cumplió los criterios 6, 7 y 8, mientras que hubo incumplimiento en los requerimientos 1 (18,9%), 2 (29,7%), 5 (67,6%) y 9 (2,7%). Al evaluar el cumplimiento de los requerimientos para la publicidad de los suplementos dietarios de acuerdo con lo establecido por el Invima (tabla 3), el 100% de las propagandas cumplieron los requerimientos 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8, y que, por el contrario, los requerimientos 3 (50%) y 9 (100%) presentaron incumplimiento.

Tabla 2. Requerimientos de publicidad en medicamentos, según el Invima.

No.	Requerimiento Invima
1	Orientar el uso adecuado del medicamento (fitoterapéutico/homeopático/convencional).
2	Ser objetiva, veraz y sin exagerar sus propiedades.
3	Señalar las indicaciones o usos, escritas en idioma castellano.
4	Prescindir de términos técnicos, a menos que estos se hayan convertido en expresiones de uso común.
5	Utilizar leyendas visibles, legibles en contraste y fijas.
6	“Es un medicamento”

(Continúa)

Tabla 2. Requerimientos de publicidad en medicamentos, según el Invima.

No.	Requerimiento Invima
7	“No exceder su consumo”
8	“Leer indicaciones y contraindicaciones”
9	“Si los síntomas persisten, consultar al médico”
10	Si los productos tienen varias indicaciones terapéuticas, el Invima podrá autorizar la publicidad para una sola indicación, siempre y cuando la misma no se entienda como exclusiva del medicamento.
11	Las bondades anunciadas del producto no se deben contraponer a la promoción de hábitos de vida saludables.

Tabla 3. Requerimientos de publicidad en suplementos dietarios, según Invima.

No.	Requerimiento Invima
1	No presentar información que confunda, exagere o engañe en cuanto a la composición, origen, efectos y otras propiedades del producto. Ni ostentar indicaciones preventivas de rehabilitación o terapéuticas.
2	No expresar o sugerir que la ingesta exclusiva de estos productos proporciona a las personas características o habilidades extraordinarias.
3	No incentivar el consumo en menores de edad.
4	No hacer comparaciones en menoscabo de las propiedades de otros productos.
5	No contraponerse a la promoción de hábitos y estilos de vida saludables.
6	No afirmar que el producto llena por sí solo los requerimientos nutricionales del ser humano.
7	No atribuir a los suplementos dietarios un valor nutritivo superior o distinto al declarado en el registro sanitario.
8	Incluir de forma visible y legible: “Este producto es un suplemento dietario, no es un medicamento”.
9	Incluir de forma visible y legible: “Este producto no sirve para el tratamiento, cura o prevención de alguna enfermedad”.

La evaluación del cumplimiento de los criterios éticos para la publicidad de medicamentos según la OMS (tabla 4), mostró que el 100% cumplen con los criterios 3 y 5, en contraste al 100% de incumplimiento en el criterio 7, y en los criterios 1 (5,4%), 2 (67,6%), 4 (10,8%) y 6 (56,8%).

Tabla 4. Criterios éticos para la publicidad de medicamentos, según la OMS.

No.	Criterios éticos de la OMS
1	No debe emplearse un lenguaje que provoque miedo o angustia.
2	El nombre del ingrediente activo utilizando la denominación común internacional (DCI) o el nombre genérico aprobado del medicamento.
3	El nombre comercial.
4	Principales indicaciones para su uso.
5	Principales precauciones, contraindicaciones y advertencias.
6	El nombre y la dirección del fabricante o distribuidor.
7	La información sobre el precio para el consumidor debe figurar de manera exacta y veraz.

Por otra parte, se evidenció que en la transmisión de cuatro propagandas de medicamentos (Genoprazol®, Medicasp®, Tukol-D®, Lomecan V®) y una de suplementos dietarios (Shot B®), se anunciaba al final de estas la siguiente expresión: *Publicidad controlada por la Superintendencia de Industria y Comercio*.

Finalmente, al revisar la condición de venta libre de los medicamentos publicitados, se encontró que todos se hallaban en el listado de medicamentos de venta libre a excepción de Genoprazol® y Aspirina Ultra®.

DISCUSIÓN

A pesar de que el tiempo de emisión dedicado a publicidad puede parecer pequeño, se debe resaltar que en Colombia, el 92,4% del total nacional de hogares colombianos poseen un televisor, según estadísticas del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) en el 2015 [14]. Esta cifra evidencia, no solo el elevado acceso de la población colombiana a este medio de comunicación, sino también el impacto que tiene la publicidad sobre los televidentes. Un estudio del análisis del contenido de publicidad televisiva de medicamentos de venta con prescripción médica en los Estados Unidos, estimó que los televidentes americanos ven al menos 16 horas de publicidad de este tipo cada año [15].

El Comité de Medicamentos, Productos Biológicos y Cosméticos del Grupo de Publicidad del Invima evalúa, previamente, la publicidad de los medicamentos de venta libre en un término no superior a ocho días hábiles y luego hace un requerimiento o niega la solicitud. Previo visto bueno de la Coordinación del Grupo de Publicidad y de la

Subdirección de Medicamentos y Productos Biológicos del Invima, la decisión es notificada al interesado en un término no mayor a quince días hábiles [4]. A pesar de este riguroso procedimiento, este estudio identificó un porcentaje importante de incumplimiento tanto de los requerimientos del Invima como de los criterios éticos de la OMS. Una mayor proporción de faltas en los AC de medicamentos que de los suplementos dietarios, son hallazgos que concuerdan con los resultados de una investigación realizada en Brasil, donde se demostró que más del 50% de los anuncios evaluados en diferentes medios de comunicación, entre ellos la televisión, no cumplió con la legislación vigente [10].

El caso de Bonfiest Plus® contiene imágenes de fiesta e incluso su nombre sugiere que es para el malestar después de una “rumba”, siendo incoherente con la indicación aprobada por el Invima: “Antiácido, para el tratamiento de trastornos dispepticos generados por exceso de bebidas no alcohólicas y comidas; analgésico y antipirético” (el subrayado es de los autores) [16]. Además, esta propaganda fue la única que no cumplió con la leyenda: “si los síntomas persisten consulte a su médico”, puesto que, a pesar de estar en la propaganda, el contraste empleado entre el texto y el fondo la hacía prácticamente invisible para declararlo como cumplimiento. Este hallazgo (presente en otras propagandas) puede dificultar su lectura, en especial a aquellas personas que tienen disminuida su agudeza visual, así como también en aquellos televisores de mediano o pequeño tamaño.

En el caso de Medicasp®, la publicidad afirma: “Tengo caspa, voy a la farmacia y compro Medicasp”, lo cual debería ser cuestionada por el Invima, ya que la caspa puede ser originada por varios factores (dermatitis seborreica, exceso de andrógenos) y no exclusiva de un hongo, en cuyo caso se induce al uso irracional del medicamento. Otro hallazgo relevante en el incumplimiento de los requerimientos del ente regulador, se evidenció con Ferroviled Ledmar®, donde durante el comercial hay un niño tomando el producto, lo que va en contra del requisito: “No incentivar el consumo en menores de edad”. Es importante anotar que Medicasp® así como Lomecan V®, son productos de un laboratorio farmacéutico, a quien la SIC en diciembre de 2015 abrió pliego de cargos por publicidad engañosa de sus productos, incluidos estos dos. Basado en la función de protección al consumidor de la SIC y en la misión de proteger y promover la salud de la población del Invima, se evidencia la necesidad de establecer mesas de trabajo conjuntas entre las dos instituciones. Asimismo, es prioritario facilitar canales de comunicación para regular y controlar todos aquellos aspectos relacionados con los medicamentos que puedan afectar a los consumidores, entre ellos el precio, el cual, a pesar de ser uno de los criterios establecidos por la OMS, no se encontró en la publicidad evaluada.

Ciertos anuncios emplearon términos subjetivos que sobrestiman los posibles efectos del medicamento: “potente”, “expulsador de flemas”, “mata el hongo de la caspa”; así como imágenes o expresiones de los protagonistas del comercial exagerando sus propiedades, lo cual va en contravía del requerimiento número 2 establecido por el Invima.

En cuanto a los criterios éticos de la OMS, se encontró que en los comerciales de Genoprazol® y Medicasp® se generó miedo o angustia con expresiones como “es el ácido quemándote” y más de la mitad de los comerciales no mostraron el nombre del ingrediente farmacéutico activo utilizando la denominación común internacional (DCI).

Al comparar la condición de venta libre de cada producto publicitado, se encontró que Genoprazol® posee una presentación de omeprazol 10 mg de venta libre y de 20 mg en condición de venta bajo receta. A pesar de que las dos presentaciones están aprobadas bajo la misma indicación: “tratamiento de úlcera duodenal, úlcera gástrica, úlceras o erosiones gástricas y duodenales relacionadas con AINE (antiinflamatorios no esteroides), erradicación del *Helicobacter pylori* en úlcera péptica, esofagitis por reflujo, reflujo gastroesofágico sintomático, dispepsia ácida y síndrome de Zollinger-Ellison”, en el comercial no se especifica cuál es la presentación que se publicita. En este caso, indirectamente se está publicitando en un medio masivo de comunicación, un medicamento de venta bajo prescripción médica, lo cual, no solo no está permitido según la normativa colombiana, sino que también tiene implicaciones en la salud pública de la población. Esta situación no solo puede retardar la atención médica especializada (en casos de cáncer gástrico, úlcera crónica, etc.), sino además puede incrementar la probabilidad de desarrollar eventos adversos e intoxicaciones por medicamentos de venta libre; como se evidenció en un estudio realizado en la ciudad de Bogotá, donde se identificaron 148 casos de reacciones adversas producidas por este grupo de medicamentos, hecho que se puede explicar, en parte, por el fácil acceso en diferentes establecimientos comerciales [17]. La presentación comercial de un medicamento no debería determinar su condición de venta (caso omeprazol, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico), pues este aspecto puede facilitar el incumplimiento de las normas.

CONCLUSIONES

Se logró cuantificar el tiempo de exposición a la publicidad de medicamentos y suplementos dietarios por parte de los televidentes colombianos e identificar AC de medicamentos que estaban bajo supervisión de la SIC por publicidad engañosa. Un porcentaje importante de publicidad incumple los requerimientos del Invima y los criterios éticos de la OMS. Los medicamentos más publicitados son los analgésicos y los destinados al aparato respiratorio.

Se evidenció la necesidad de establecer canales de comunicación entre el Invima y la SIC para articular mesas de trabajo conjuntas y así poder obtener mejores resultados como entes interesados fundamentalmente en proteger a la población por medio de acciones de control.

Se recomienda hacer un ajuste a los criterios actualmente establecidos por el Invima para corregir cierto grado de subjetividad y tener en cuenta los criterios establecidos por la OMS, entre ellos, que en la publicidad sea visible el precio de los medicamentos para así contribuir a la regulación de precios en el país.

Por último, este trabajo contribuye a la vigilancia activa de medicamentos de venta libre y suplementos dietarios cuando ya están en la etapa de publicidad y comercialización.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. UNICEF, La televisión en familia. URL: <http://www.unicef.cl/centrodoc/tesue-nafamiliar/16%20Conviviendo%20TV.pdf>, consultado en octubre de 2016.
2. E. Torres, C. Muñoz, Estrategias de posicionamiento basadas en la cultura del consumidor: un análisis de la publicidad en televisión, *Estud. Gerenc.*, **22**, 71-81 (2006).
3. E.S. Olaya, R.G. García, N.S. Torres, D.C. Ferro, S. Torres, Caracterización del proceso productivo, logístico y regulatorio de los medicamentos, *Vitae*, **13**, 69-82 (2006).
4. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima), ABC de publicidad medicamentos. URL: https://www.invima.gov.co/images/stories/ABCpublicidad/Cartilla_Medicamentos.pdf, consultado en junio de 2016.
5. República de Colombia, Ministerio de Protección Social, Resolución 4320 de 2004, *Diario Oficial* 45.762 (14 de diciembre de 2004).
6. Superintendencia de Industria y Comercio, Información institucional. URL: <http://www.sic.gov.co/drupal/objetivos-y-funciones>, consultado en octubre de 2016.

7. República de Colombia, Ministerio de Comercio, Industria y Turismo, Superintendencia de Industria y Comercio, Resolución 94423 de 2015.
8. A. Aguzzi, C. Virga, Uso racional de medicamentos: la automedicación como consecuencia de la publicidad, *Arch. Venez. Farmacol. Terapéut.*, **28**, 28-30 (2009).
9. H.S. Suh, D. Lee, S.Y. Kim, D.H. Chee, H.Y. Kang, Direct-to-consumer advertising (DTCA) for prescription drugs: Consumers' attitudes and preferences concerning its regulation in South Korea, *Health Policy*, **101**, 260-268 (2011).
10. L.F. Wzorek, C.J. Correr, A.C. Badaró-Trinidad, R. Pontarolo, Analysis of medicine advertisement produced in Brazil, *Pharm. Pract.*, **5**, 105-108 (2007).
11. C. Vacca, C. Vargas, M. Cañas, L. Reveiz, Publicidad y promoción de medicamentos: regulaciones y grado de acatamiento en cinco países de América Latina, *Rev. Panam. Salud Pública*, **29**, 76-83 (2011).
12. N. Othman, A. Vitry, E.E. Roughead, Quality of pharmaceutical advertisements in medical journals: A systematic review, *PLoS One*, **4**, e6350 (2009).
13. W. Zachry, D. Ginsburg, Patient autonomy and the regulation of direct-to-consumer advertising, *Clin. Ther.*, **23**, 2024-2037 (2001).
14. DANE, Indicadores básicos de TIC en hogares, URL: <http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/tecnologia-e-innovacion/tecnologias-de-la-informacion-y-las-comunicaciones-tic/indicadores-basicos-de-tic-en-hogares?phpMyAdmin=3om27vamm65hhkhrtgc8rrn2g4>, consultado en junio de 2016.
15. D.L. Frosch, P.M. Krueger, R.C. Hornik, P.F. Cronholm, F.K. Barg, Creating demand for prescription drugs: A content analysis of television direct-to-consumer advertising, *Ann. Fam. Med.*, **5**, 6-13 (2007).
16. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima), Consulta registro sanitario, URL: http://farmacovigilancia.invima.gov.co:8082/Consultas/consultas/consreg_encabcum.jsp, consultado en julio de 2016.
17. J. Montaña, "Caracterización de eventos adversos e intoxicaciones por medicamentos con condición de comercialización venta libre (Programa distrital de farmacovigilancia Bogotá 2008-2012)", trabajo de grado, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA), Bogotá, 2014, pp. 13-20.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO:

A.A. González-Acuña, L.D. Vargas-Zapata, J.J. López-Gutiérrez, Evaluación de la publicidad de medicamentos y suplementos dietarios en un canal de televisión dentro de la franja horaria central, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 47(2), 169-183 (2018).

Synthesis and physicochemical studies of vanillin chalcones

Shipra Baluja^{1*}, Nayan Vakariya¹, Asmita Hirapara¹

¹ Physical Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, Saurashtra University, Rajkot-360005 (Gujarat), India.

* E-mail: shipra_baluja@rediffmail.com.

Received: August 10, 2017

Accepted: March 5, 2018

SUMMARY

Some chalcone compounds are synthesized and their characterization was done by spectroscopic techniques such as IR, NMR and mass spectrometry. Some physicochemical properties such as acoustical properties, refractive index, conductance and partition coefficient have been studied for these synthesized compounds in N, N-dimethyl formamide and chloroform at 303.15 K. The studied properties are useful in QSAR studies and applications of these compounds in various other fields. It is observed that these parameters are affected by solvent and substitutions present in compounds.

Key words: Synthesis, Chalcones, N, N-dimethyl formamide, chloroform, acoustical properties, refractive index, conductance, partition coefficient.

RESUMEN

Síntesis y estudios fisicoquímicos de vainillin-chalconas

Se sintetizaron algunos compuestos del tipo chalcona y su caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas tales como IR, RMN y espectrometría de masa. Algunas propiedades fisicoquímicas tales como propiedades acústicas, índice de refracción, conductancia y coeficiente de reparto se estudiaron, para los compuestos sintetizados, en N,N-dimetil formamida y cloroformo a 303,15 K. Las propiedades estudiadas son útiles en estudios QSAR y en aplicaciones de estos compuestos en otros campos. Se observa que estos parámetros se ven afectados por el disolvente y las sustituciones presentes en los compuestos.

Palabras clave: síntesis, chalconas, N,N-dimetil formamida, cloroformo, propiedades acústicas, índice de refracción, conductancia, coeficiente de reparto.

INTRODUCTION

Chalcones are one of the most important classes of flavonoids across the whole plant kingdom [1, 2]. The chemistry of chalcones has generated intensive scientific studies throughout the world due to the large number of replaceable hydrogens that allows a large number of derivatives and a variety of promising biological activities to be generated e.g., anti-microbial [3], anti-cancer [4], anti-inflammatory [5], anti-malarial [6], anti-allergic [7], anti-oxidant [8], anti-infective [9], anti-influenza [10], anti-protozoal [11] etc. In modified form, these compounds are widely distributed in foods and beverages such as vegetables, fruits, tea, soy-based foodstuff and spices [12, 13].

Chalcones are multifunctional molecules, since one particular structure can show multiple biological activities. These compounds are known to be excellent scaffolds for synthetic manipulation with multiple pharmacological properties [14-17]. Various other industrial and pharmaceutical applications of chalcones have also been reported [18-21]. Nowadays, an emerging interest is focused on the role of chalcones in agricultural systems. Regarding pest defense and weed control, the most interesting biological activities of chalcones are the bactericide, antifungal, antihelmintic, insecticidal, insect antifeedant, antiviral and phytotoxic activities [22-24].

There are a lot of chalcone derivatives that have been synthesized and identified by researchers in the laboratory through different chemical methods [25]. The synthesis of new compounds based on the chalcone skeleton provides a new world of possibilities for biological activities and applications [26-30].

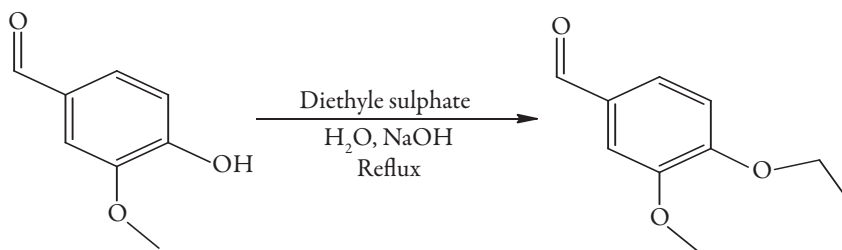
Thus, due to importance of this class of compounds, in the present paper, some novel chalcone derivatives are synthesized and their physicochemical properties such as refractive index, conductance, dissociation constant, acoustical parameters, partition function etc., are studied in N, N, dimethyl formamide and chloroform at 303.15 K, which will be useful for application of these compounds in various fields.

EXPERIMENTAL

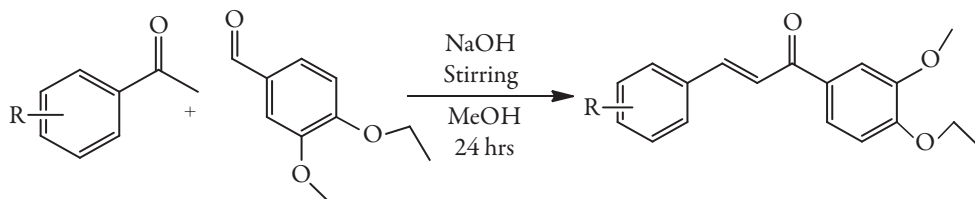
Synthesis

An aqueous solution of vanillin was refluxed at 95-97°C for half an hour with stirring. To this solution, few drops of NaOH and diethyl sulphate were added slowly and again the reaction mixture was refluxed for 5 to 7 hrs with stirring. After the completion of

reaction, organic layer was isolated and cooled at room temperature. The solid crude product (3-methoxy4-ethoxybenzaldehyde) was isolated and crystallized from absolute ethanol.



A mixture of above synthesized product 3-methoxy4-ethoxy benzaldehyde and substituted acetophenone in methanol was stirred for 24 h in presence of few drops of sodium hydroxide solution. The product was filtered and dried. The recrystallization was done in ethanol.



Similarly, other compounds were synthesized. Table 1 shows the different substitutions and physical parameters of all the synthesized compounds. These chalcone compounds are used for physicochemical studies after crystallization.

Table 1. The physical constants of the synthesized compounds.

Sr. No.	Compound Code	Substitution -R	M.F.	M.Wt. (g/mol)	M.P. ^o C	Yield %
1	C-1	4-Cl	C ₁₈ H ₁₇ ClO ₃	316	153	73
2	C-2	4-NO ₂	C ₁₈ H ₁₇ NO ₅	327	153	59
3	C-3	-H	C ₁₈ H ₁₈ O ₃	282	132	66
4	C-4	4-CH ₃	C ₁₈ H ₂₀ O ₃	296	124	67
5	C-5	4-OCH ₃	C ₁₈ H ₂₀ O ₄	312	151	73
6	C-6	4-Br	C ₁₈ H ₁₇ -BrO ₃	361	134	57
7	C-7	4-OH	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	298	133	59
8	C-8	2, 4-OCH ₃	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	343	129	64
9	C-9	3-Cl	C ₁₈ H ₁₇ ClO ₃	316	170	75

Physicochemical studies

The N, N-dimethyl formamide (DMF) and chloroform used was of AR grade supplied by Spectrochem Pvt. Ltd. (Mumbai, India) and was purified according to the standard procedure [31]. The purity of solvents were confirmed by GC-MS (SHIMADZU-Model No.-QP-2010) equipped with column (DB-5MS, 25 m in length, 0.20 mm internal diameter and 0.33 μ m film) and was found to be more than 99.98%.

Solutions of different concentrations were made in DMF and chloroform for all the synthesized compounds.

Acoustical parameters: The density, sound velocity and viscosity of synthesized compounds are measured in N, N-dimethylformamide and chloroform solutions of wide range of concentrations at 303.15 K. With these experimental data, some acoustical parameters such as adiabatic compressibility (κ_s), intermolecular free length (L_f), solvation number (S_n), etc., have been computed to study molecular interactions in solutions.

Measurements of Density and Ultrasound velocity: The ultrasonic velocity and density measurements of pure solvents and solutions of different chalcones have been done by using Mittal enterprises ultrasonic Interferometer (Model No. F81) and pyknometer with accuracy of density and velocity are ± 0.05 kg/m³ and ± 0.5 m/s respectively. The instrument was fully automated and the temperature was automatically controlled. Calibration was carried out using double distilled water.

Measurement of viscosity: The Ubbelohde viscometer with 25 ml capacity was used for the viscosity measurement with accuracy $\pm 0.06\%$. The viscometer was calibrated with fresh conductivity water immersed in a water bath that was maintained at the experimental temperature, 303.15 K. The flow time of water (t_w), of pure solvents and the flow time of solution, (t_s) were measured with a digital stop watch with an accuracy of ± 0.01 s (Model: RACER HS-10W). The temperature stability was maintained by circulating water from a thermostat (NOVA NV-8550 E, accuracy of ± 0.1 K) around the viscometer. The accuracy of viscosity is $\pm 0.05\%$.

Refractive index: The Abbe refractometer was used for the measurement of refractive index of solutions of synthesized compounds at 303.15 K.

Conductance: For all the synthesized chalcones, conductance is measured in DMF and chloroform solutions at 303.15 K. The conductance of each solution was measured by using Equip-tronics conductivity meter (Model No. 664) having a cell constant 0.86 cm⁻¹ at 303.15 K.

Partition coefficient: n-Octanol is of analytical grade. The purity of solvent was checked by GC and found to be 99.9%. Milli-Q-water was used throughout for all experiments.

Preparation of standard solution: 10 mg sample was dissolved in n-octanol to give 100 ml solution of 100 ppm. Using this standard solution, $\lambda_{\max}$ was determined using UV spectrophotometer (Shimadzu, UV-1700, Pharmaspec). Suitable dilutions were made from this standard solution ($2\ \mu\text{g}$ to $20\ \mu\text{g}$) and absorbance (OD) was measured. The plot of absorbance versus concentration gives the calibration curve.

A known concentration of the compound solution was prepared in n-octanol. Equal volumes of this solution and water is mixed in oven dried stoppered flask and the mixture was stirred for 24 h at room temperature. After 24 h, the solution was transferred into 250 ml of separating funnel and allowed to stand in order to separate the aqueous and organic layers. The organic layer will be upper one while lower will be aqueous. The organic layer was then analyzed by UV spectrophotometer. Using calibration curve, the concentration of compounds in organic layer was then evaluated.

As partition coefficient is highly influenced by pH, a wide range of pH (0.84 to 8.0) is selected. For 0.84 pH, 0.1 N HCl was taken whereas for 6.0, 7.4 and 8.0, phosphate buffer was used.

Dissociation constant: For each compound, 100 ppm solution was prepared in DMF. This solution was used to determine the $\lambda_{\max}$ using UV spectrophotometer (Shimadzu, UV-1700, Pharmaspec) equipped with 1 cm path length cell, controlled by computer.

An electrical balance (Mettler Toledo AB204-S) with an accuracy of $\pm 0.1\text{mg}$ was used for solution preparation.

The following sets of solution were prepared.

Set I: 2 ml HNO_3 (0.01 M) + 4 ml NaNO_3 (0.01 M) + 19 ml DMF

Set-II: 2 ml HNO_3 (0.01 M) + 4 ml NaNO_3 (0.01 M) + 2 ml compound solution (15 ppm) + 17 ml DMF

Thus, total volume of each set was 25 ml and DMF: water ratio was 90: 10 (v/v).

To each set of solution, pH and absorbance were measured after each addition of 0.1 ml NaOH till there is no change in absorbance.

A Systronic pH meter (Model No. EQ-664) was calibrated with buffer solutions of known pH. The buffers used were potassium hydrogen phthalate and sodium borate decahydrate. The pH of all the solutions was measured by pH meter. The accuracy of pH meter was ± 0.01 pH unit.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical Studies

Acoustical properties: The experimental values of density (ρ), viscosity (η) and ultrasonic velocity (U) of pure solvents and solutions of synthesized compounds are given in Table 2.

Table 2. The density (ρ)*, ultrasonic velocity (U)* and viscosity (η)* of synthesized compounds in DMF and Chloroform at 303.15 K.

Conc. (M)	Density ρ (g.cm ⁻³)	Velocity U. 10 ⁻⁵ (cm.s ⁻¹)	Viscosity η .10 ³ (poise)	Density ρ (g.cm ⁻³)	Velocity U. 10 ⁻⁵ (cm.s ⁻¹)	Viscosity η .10 ³ (poise)
DMF				Chloroform		
C-1						
0.00	0.9417	1.4388	5.7887	1.4748	0.9696	4.2657
0.01	0.9430	1.4444	6.7031	1.4749	0.9712	4.4573
0.02	0.9438	1.4448	6.7998	1.4750	0.9730	4.4754
0.04	0.9460	1.4468	7.7111	1.4752	0.9744	4.5120
0.06	0.9482	1.4472	8.0514	1.4754	0.9760	4.5152
0.08	0.9593	1.4484	8.4512	1.4758	0.9784	4.5384
0.10	0.9512	1.4492	8.6957	1.4762	0.9831	4.5528
C-2						
0.01	0.9424	1.4416	5.9300	1.4783	0.9694	4.4755
0.02	0.9427	1.4420	6.0617	1.4786	0.9708	4.4942
0.04	0.9440	1.4424	6.1245	1.4753	0.9732	4.5198
0.06	0.9455	1.4440	6.1831	1.4757	0.9768	4.5235
0.08	0.9456	1.4456	6.2415	1.4761	0.9792	4.5450
0.10	0.9468	1.4464	6.3309	1.4763	0.9818	4.5609
C-3						
0.01	0.9422	1.4424	5.8534	1.4750	0.9697	4.4895
0.02	0.9432	1.4432	5.9756	1.4755	0.9702	4.5089
0.04	0.9426	1.4436	6.1154	1.4760	0.9715	4.5459

(Continue)

Table 2. The density (ρ)*, ultrasonic velocity (U)* and viscosity (η)* of synthesized compounds in DMF and Chloroform at 303.15 K (*continuation*).

Conc. (M)	Density ρ (g.cm ⁻³)	Velocity U. 10 ⁻⁵ (cm.s ⁻¹)	Viscosity η .10 ³ (poise)	Density ρ (g.cm ⁻³)	Velocity U. 10 ⁻⁵ (cm.s ⁻¹)	Viscosity η .10 ³ (poise)
DMF				Chloroform		
C-3						
0.06	0.9445	1.4444	6.2529	1.4765	0.9754	4.5501
0.08	0.9458	1.4448	6.3209	1.4769	0.9770	4.5717
0.10	0.9461	1.4460	6.3751	1.4772	0.9798	4.5879
C-4						
0.01	0.9429	1.4396	6.0305	1.4764	0.9698	4.5104
0.02	0.9431	1.4404	6.4214	1.4767	0.9707	4.5290
0.04	0.9443	1.4412	6.7278	1.4771	0.9730	4.5660
0.06	0.9453	1.4420	6.8952	1.4775	0.9754	4.5698
0.08	0.9474	1.4432	7.1380	1.4779	0.9780	4.5914
0.10	0.9476	1.4456	7.2121	1.4781	0.9820	4.6073
C-5						
0.01	0.9418	1.4396	5.8971	1.4763	0.9700	4.4639
0.02	0.9429	1.4400	5.9591	1.4760	0.9705	4.4826
0.04	0.9437	1.4412	6.0519	1.4761	0.9722	4.5196
0.06	0.9447	1.4424	6.1599	1.4765	0.9747	4.5233
0.08	0.9463	1.4436	6.2209	1.4768	0.9771	4.5448
0.10	0.9464	1.4448	6.2419	1.4770	0.9799	4.5607
C-6						
0.01	0.9422	1.4436	5.9417	1.4757	0.9740	4.5579
0.02	0.9433	1.4448	5.9982	1.4762	0.9753	4.5784
0.04	0.9445	1.4488	6.0790	1.4767	0.9755	4.6295
0.06	0.9458	1.4496	6.2086	1.4771	0.9771	4.6498
0.08	0.9473	1.4504	6.3114	1.4774	0.9785	4.6710
0.10	0.9476	1.4508	6.3477	1.4781	0.9795	4.6873

(Continue)

Table 2. The density (ρ)*, ultrasonic velocity (U)* and viscosity (η)* of synthesized compounds in DMF and Chloroform at 303.15 K (*continuation*).

Conc. (M)	Density ρ (g.cm ⁻³)	Velocity U. 10 ⁻⁵ (cm.s ⁻¹)	Viscosity η .10 ³ (poise)	Density ρ (g.cm-3)	Velocity U. 10 ⁻⁵ (cm.s ⁻¹)	Viscosity η .10 ³ (poise)
DMF				Chloroform		
C-7						
0.01	0.9445	1.4460	6.1651	1.4756	0.9684	4.4875
0.02	0.9449	1.4500	6.2710	1.4760	0.9686	4.5027
0.04	0.9479	1.4532	6.5356	1.4764	0.9701	4.5169
0.06	0.9487	1.4568	6.7900	1.4769	0.9734	4.5364
0.08	0.9503	1.4612	6.9038	1.4774	0.9743	4.5643
0.10	0.9543	1.4628	7.1169	1.4776	0.9796	4.6324
C-8						
0.01	0.9461	1.4464	6.0496	1.4750	0.9678	4.5164
0.02	0.9465	1.4508	6.1976	1.4754	0.9688	4.5314
0.04	0.9471	1.4568	6.4258	1.4761	0.9715	4.5526
0.06	0.9491	1.4600	6.7800	1.4766	0.9754	4.6037
0.08	0.9507	1.4616	7.0589	1.4769	0.9770	4.6238
0.10	0.9516	1.4640	7.9042	1.4772	0.9798	4.6451
C-9						
0.01	0.9434	1.4424	6.0086	1.4759	0.9690	4.5118
0.02	0.9441	1.4444	6.0496	1.4760	0.9700	4.5272
0.04	0.9447	1.4456	6.0827	1.4765	0.9727	4.5475
0.06	0.9454	1.4468	6.1336	1.4773	0.9766	4.5996
0.08	0.9462	1.4476	6.2243	1.4785	0.9782	4.6224
0.10	0.9472	1.4488	6.3912	1.4788	0.9810	4.6438

*Uncertainties: Density (ρ): ± 0.0001 g.cm⁻³; Ultrasonic velocity (U): 0.01 % ; Viscosity (η): ± 0.01 s

To study molecular interactions of compounds in solutions, some acoustical and apparent parameters such as intermolecular free path length (L_f), adiabatic compressibility (κ_s), relaxation strength (r), Rao's molar sound function (R_m), Van der Waal's constant (b), molar compressibility (W), solvation number (S_n), apparent molar compressibility

(ϕ_k) and apparent molar volume (ϕ_v) were evaluated using experimental data using following equations:

Intermolecular free path length: $L_f = K_j \kappa_s^{1/2}$

Where K_j is a temperature-dependent Jacobson's constant $(93.875 + 0.375T) \times 10^{-8}$.

Isentropic compressibility: $\kappa_s = 1/U^2 \rho$

Relaxation Strength: $r = 1 - (U/U_0)^2$, where $U_0 = 1.6 \times 10^5$ cm/s.

Rao's molar sound function: $R_m = (M/\rho)U^{1/3}$, where M is the molecular weight of solution.

Van der Waal's Constant: $b = (M/\rho) (1-RT/MU^2 (\sqrt{1+MU^2/3RT}-1))$

where R is gas constant and T is absolute temperature.

Solvation number: $S_n = \frac{M_2}{M_1} \left[\frac{1-\kappa_s}{\kappa_{s1}} \right] \left[\frac{100-X}{X} \right]$

Where X is the number of grams of solute in 100 gm of the solution. M_1 and M_2 are the molecular weights and κ_{s1} and κ_s are adiabatic compressibility of pure solvent and solute respectively.

Some of these thermodynamic parameters are given in Table 3.

Table 3. Some acoustical parameters of synthesized compounds in DMF and chloroform.

Conc. (M)	L _f A _o	<i>r</i>	R _m . 10 ⁻³ (cm ^{8/3} .s ^{-1/3})	<i>b</i> (cm ³ .mol ⁻¹)	L _f A _o	<i>r</i>	R _m . 10 ⁻³ (cm ^{8/3} .s ^{-1/3})	b (cm ³ .mol ⁻¹)
DMF					Chloroform			
C-1								
0.00	0.1502	0.1913	4.0670	77.6131	0.1780	0.6328	3.7225	81.0257
0.01	0.1495	0.1850	4.1120	78.3705	0.1778	0.6316	3.7376	81.3111
0.02	0.1494	0.1846	4.1542	79.1661	0.1774	0.6302	3.7529	81.5909
0.04	0.1490	0.1823	4.2364	80.6957	0.1771	0.6291	3.7801	82.1439
0.06	0.1488	0.1819	4.3164	82.2103	0.1768	0.6279	3.8079	82.7028
0.08	0.1486	0.1805	4.4018	83.8148	0.1764	0.6260	3.8366	83.2579
0.10	0.1483	0.1796	4.4823	85.3348	0.1755	0.6225	3.8681	83.8072

(Continue)

Table 3. Some acoustical parameters of synthesized compounds in DMF and chloroform (*continuation*).

Conc. (M)	L _f A _o	r	R _m . 10 ⁻³ (cm ^{8/3} .s ^{-1/3})	b (cm ³ .mol ⁻¹)	L _f A _o	r	R _m . 10 ⁻³ (cm ^{8/3} .s ^{-1/3})	b (cm ³ .mol ⁻¹)
DMF					Chloroform			
C-2								
0.01	0.1498	0.1882	4.1158	78.3607	0.1779	0.6329	3.7277	81.1451
0.02	0.1497	0.1877	4.1639	79.5521	0.1776	0.6319	3.7430	81.4397
0.04	0.1496	0.1873	4.2564	81.9877	0.1774	0.6300	3.7834	82.2482
0.06	0.1493	0.1855	4.3485	84.3850	0.1767	0.6273	3.8157	82.8502
0.08	0.1491	0.1837	4.4473	86.7819	0.1762	0.6255	3.8466	83.8502
0.10	0.1490	0.1828	4.5395	89.1708	0.1757	0.6235	3.8782	84.0640
C-3								
0.01	0.1497	0.1904	4.1032	78.2372	0.1780	0.6327	3.7319	81.2282
0.02	0.1496	0.1895	4.1370	78.8685	0.1779	0.6323	3.7409	81.4106
0.04	0.1496	0.1886	4.2044	80.1451	0.1776	0.6313	3.7608	81.8059
0.06	0.1494	0.1877	4.2687	81.3553	0.1769	0.6284	3.7838	82.1984
0.08	0.1492	0.1864	4.3322	82.5585	0.1766	0.6271	3.8043	82.5961
0.10	0.1491	0.1837	4.4012	83.8502	0.1761	0.6250	3.8264	82.9991
C-4								
0.01	0.1500	0.1904	4.1016	78.2582	0.1779	0.6326	3.7298	81.1793
0.02	0.1499	0.1895	4.1405	78.9851	0.1777	0.6319	3.7413	81.4041
0.04	0.1497	0.1886	4.2136	80.3662	0.1773	0.6302	3.7652	81.8583
0.06	0.1495	0.1877	4.2874	81.7583	0.1768	0.6283	3.7893	82.3158
0.08	0.1492	0.1864	4.3559	83.0409	0.1764	0.6264	3.8137	82.7733
0.10	0.1490	0.1837	4.4346	84.4952	0.1756	0.6233	3.8405	83.2403
C-5								
0.01	0.1502	0.1904	4.1115	78.4477	0.1779	0.6324	3.7345	81.2746
0.02	0.1501	0.1900	4.1511	79.1961	0.1778	0.6321	3.7471	81.5359
0.04	0.1499	0.1886	4.2367	80.8065	0.1775	0.6308	3.7735	82.0629

(Continue)

Table 3. Some acoustical parameters of synthesized compounds in DMF and chloroform (*continuation*).

Conc. (M)	L _f A _o	<i>r</i>	R _m · 10 ⁻³ (cm ^{8/3} ·s ^{-1/3})	<i>b</i> (cm ³ ·mol ⁻¹)	L _f A _o	<i>r</i>	R _m · 10 ⁻³ (cm ^{8/3} ·s ^{-1/3})	<i>b</i> (cm ³ ·mol ⁻¹)
DMF					Chloroform			
C-5								
0.06	0.1497	0.1873	4.23211	82.3927	0.1770	0.6289	3.8012	82.5932
0.08	0.1495	0.1859	4.5021	83.9147	0.1766	0.6270	3.8288	83.1253
0.10	0.1493	0.1846	4.4904	85.5744	0.1760	0.6249	3.8573	83.6651
C-6								
0.00	0.1502	0.1859	4.1239	78.6107	0.1780	0.6328	3.7225	81.0257
0.01	0.1496	0.1846	4.1745	79.5541	0.1773	0.6298	3.7421	81.3428
0.02	0.1494	0.1801	4.2815	81.5177	0.1772	0.6294	3.7580	81.6756
0.04	0.1489	0.1792	4.3844	83.4616	0.1769	0.6284	3.7907	82.3498
0.06	0.1487	0.1783	4.4858	85.3748	0.1769	0.6283	3.8220	83.0226
0.08	0.1485	0.1778	4.5925	87.3990	0.1765	0.6270	3.8552	83.6980
C-7								
0.01	0.1502	0.1832	4.1230	78.1896	0.1784	0.6337	3.7375	81.3855
0.02	0.1492	0.1787	4.1862	79.6814	0.1782	0.6335	3.7551	81.7635
0.04	0.1487	0.1751	4.2974	81.7382	0.1776	0.6324	3.7926	82.5377
0.06	0.1482	0.1710	4.4178	83.9587	0.1769	0.6299	3.8325	83.3108
0.08	0.1477	0.1660	4.5366	86.1295	0.1766	0.6292	3.8692	84.0840
0.10	0.1472	0.1641	4.6376	88.0154	0.1761	0.6251	3.9125	84.8702
C-8								
0.01	0.1492	0.1828	4.1040	78.1817	0.1784	0.6341	3.7340	81.3251
0.02	0.1487	0.1778	4.1570	79.1112	0.1782	0.6333	3.7487	81.6188
0.04	0.1482	0.1710	4.2559	80.8809	0.1776	0.6313	3.7792	82.2052
0.06	0.1477	0.1673	4.3469	82.5499	0.1769	0.6284	3.8115	82.7997
0.08	0.1472	0.1665	4.4376	84.2428	0.1766	0.6271	3.8416	83.4050
0.10	0.1467	0.1628	4.5324	85.9938	0.1761	0.6250	3.8730	84.0097

(Continue)

Table 3. Some acoustical parameters of synthesized compounds in DMF and chloroform (*continuation*).

Conc. (M)	L _f A _o	<i>r</i>	R _m . 10 ⁻³ (cm ^{8/3} .s ^{-1/3})	<i>b</i> (cm ³ .mol ⁻¹)	L _f A _o	<i>r</i>	R _m . 10 ⁻³ (cm ^{8/3} .s ^{-1/3})	b (cm ³ .mol ⁻¹)
<i>DMF</i>					<i>Chloroform</i>			
C-9								
0.01	0.1502	0.1873	4.1027	78.2281	0.1781	0.6332	3.7310	81.2273
0.02	0.1496	0.1850	4.1411	78.9232	0.1779	0.6324	3.7423	81.4450
0.04	0.1494	0.1837	4.2185	80.3776	0.1774	0.6304	3.7673	81.9133
0.06	0.1492	0.1823	4.2954	81.8192	0.1766	0.6275	3.7926	82.3561
0.08	0.1490	0.1814	4.3411	83.2469	0.1763	0.6262	3.8141	82.7749
0.10	0.1489	0.1801	4.4450	84.6308	0.1757	0.6241	3.8393	83.2443

Figure 1 shows the variation of ultrasound velocity with concentration in DMF and chloroform. It is observed that overall ultrasonic velocity increases with concentration for all the synthesized compounds in both the solvents. The velocity depends on intermolecular free length (L_f).

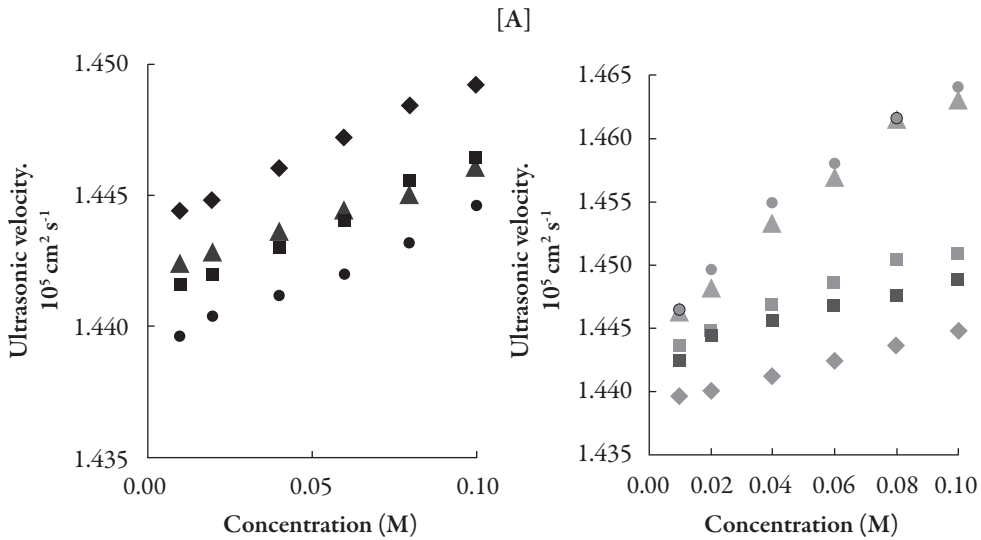


Figure 1. The variation of ultrasonic velocity with concentration for compounds in [A] DMF and [B] Chloroform at 303.15 K. ♦: C-1. ■: C-2. ▲: C-3. ●: C-4. ♦: C-5. ■: C-6. ▲: C-7. ●: C-8. ■: C-9.

(Continue)

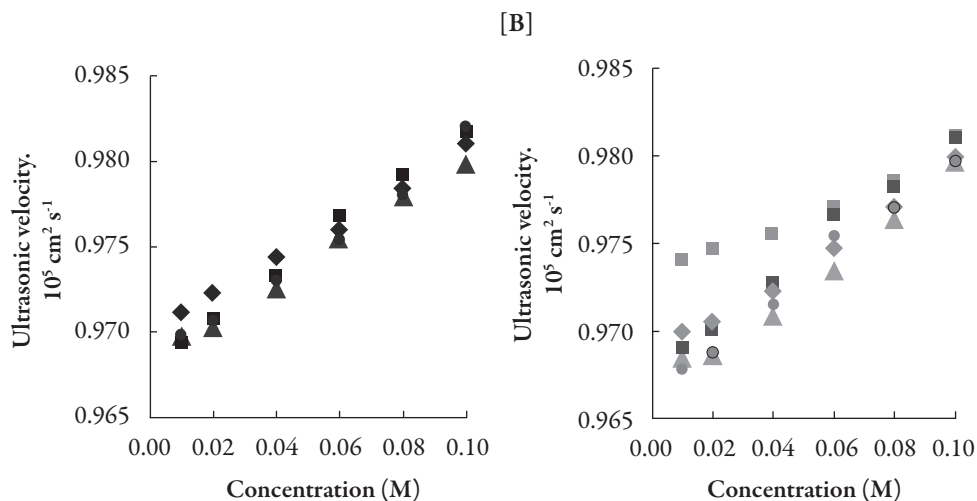


Figure 1. The variation of ultrasonic velocity with concentration for compounds in [A] DMF and [B] Chloroform at 303.15 K. ♦: C-1. ▪: C-2. ▲: C-3. ●: C-4. ◆: C-5. ■: C-6. ▲: C-7. ●: C-8. ■: C-9. (Continuation)

The increase in intermolecular free length causes decrease in ultrasonic velocity or vice versa. Thus, ultrasonic velocity is reverse of intermolecular free length. Table 3 shows that intermolecular free length (L_f) decreases with increase in concentration although ultrasonic velocity increases with concentration.

The decrease of intermolecular free length with increase of concentration suggests that the distance between solute and solvent molecules decrease due to increase in solute-solvent interactions, which causes velocity to increase. This is supported by isentropic compressibility (κ_s) and relaxation strength (r). Figure 2 shows the variation of isentropic compressibility (κ_s) with increase in concentration.

The decrease in isentropic compressibility with increasing concentration might be due to aggregation of solvent molecules around chalcone molecules indicating thereby presence of solute-solvent interactions. This is supported by decrease in relaxation strength (r) with concentration in studied systems (as shown in Table 3).

Table 3 shows the increase of molar sound function (R_m) and Vander Waals constant (b) with concentration for all the compounds. The correlation coefficients for these parameters are in the range of 0.9989-0.9999. This linear increase of these parameters suggests the absence of complex formation in these systems.

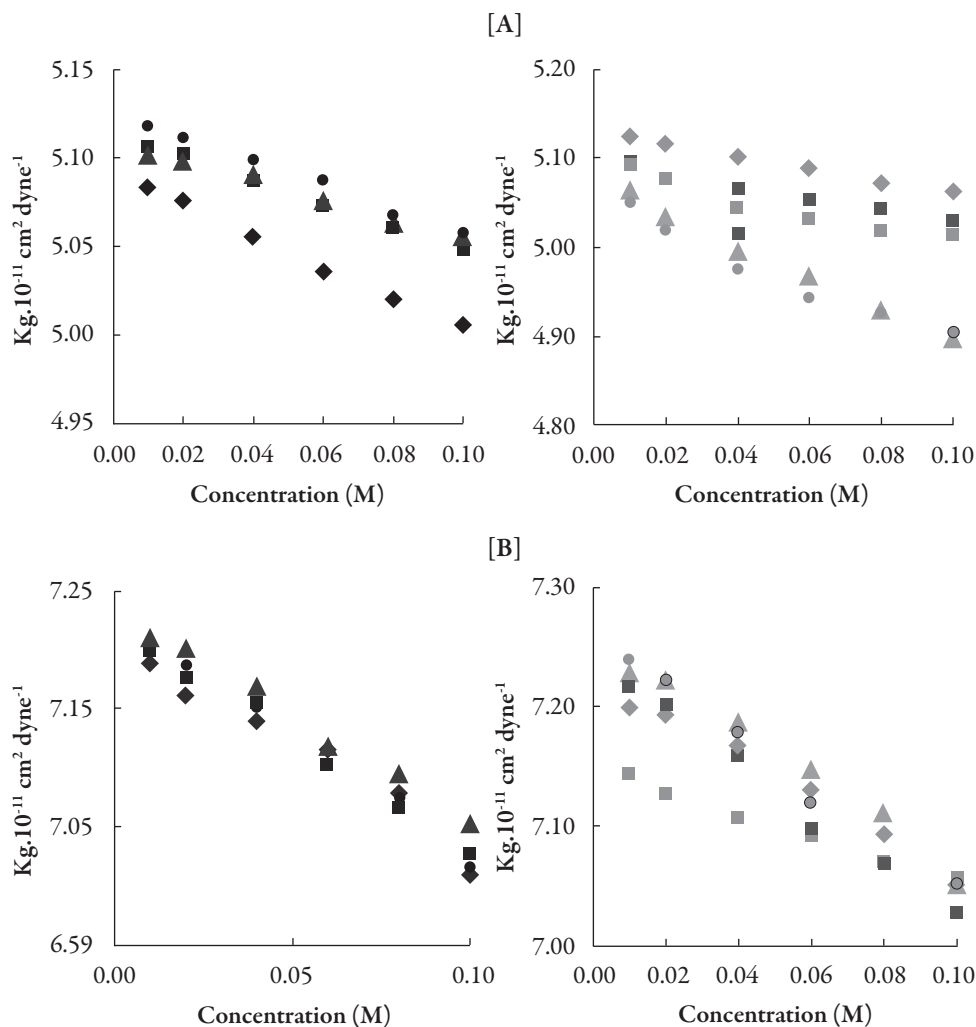


Figure 2. The variation of isentropic compressibility (κ_s) with concentration for compounds in [A] DMF and [B] Chloroform at 303.15 K. ◆: C-1. ■: C-2. ▲: C-3. ●: C-4. ◊: C-5. ■: C-6. ▲: C-7. ●: C-8. ■: C-9.

The type of interactions between solute and solvent molecules can also be suggested by solvation number (S_n), which gives the information about structure forming tendency or structure breaking tendency of a compound in solutions. Figure 3 shows variation of solvation number of compounds with concentration in both the solvents.

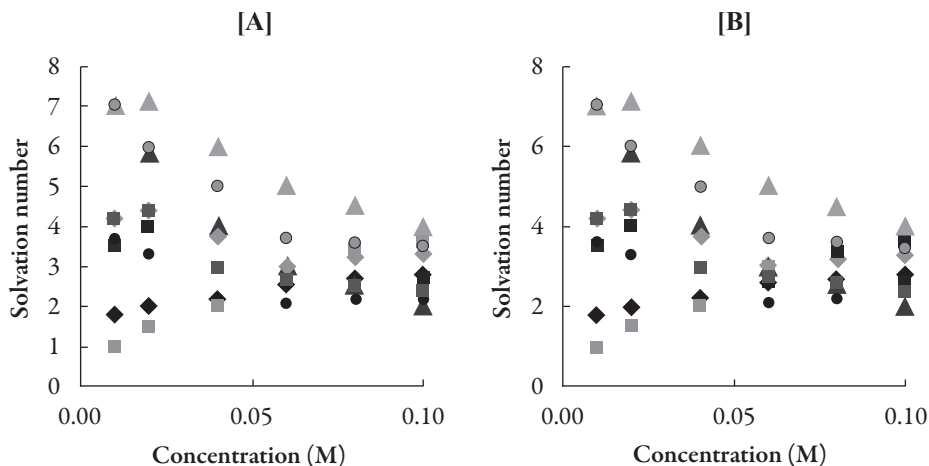


Figure 3. The variation of solvation number with concentration for compounds in [A] DMF and [B] Chloroform at 303.15 K. ◆: C-1. ■: C-2. ▲: C-3. ●: C-4. ◆: C-5. ■: C-6. ▲: C-7. ●: C-8. ■: C-9.

It is observed that for the studied compounds, the solvation numbers are positive in both the solvents. However, values are higher in DMF than those in chloroform. As evident from Figure, in DMF, S_n values increases continuously with concentration for all the compounds. However in chloroform, for all the compounds except C-6, S_n values decreases with concentration. This suggests that in DMF, the studied compounds exhibited structure forming tendency due to solute-solvent interaction between solute and solvent molecules which causes an increase in solvation number. As solute concentration increases, solute-solvent interactions also increases which causes increase in aggregation of molecules i.e. structure forming tendency of solute. In chloroform, as concentration increases, structure forming tendency decreases. This indicates that in chloroform, with increase in concentration, solute-solute interactions predominates.

Thus, comparison of solvation number in the two solvents shows that in DMF, structure forming tendency is much higher than that in chloroform. This indicates the existence of considerable amount of solute-solute interactions in chloroform solutions.

Refractive index: Table 4 shows the experimental values of densities and refractive index of solutions of all the ten synthesized compounds in DMF and chloroform at 303.15 K.

Table 4. The density (ρ_{12}) and refractive index (n) of chalcones in DMF and chloroform at 303.15 K.

Conc. (M)	ρ_{12} (g.cm ⁻³)	n	ρ_{12} (g.cm ⁻³)	n
DMF			Chloroform	
C-1				
0.00	0.9417	1.4271	1.4748	1.436
0.01	0.9430	1.4295	1.4781	1.4371
0.02	0.9438	1.4300	1.4792	1.4392
0.04	0.9460	1.4305	1.4752	1.4403
0.06	0.9482	1.4315	1.4754	1.4417
0.08	0.9493	1.4320	1.4757	1.4429
0.10	0.9512	1.4325	1.4761	1.4475
C-2				
0.01	0.9424	1.4289	1.4748	1.4365
0.02	0.9427	1.4299	1.4749	1.4371
0.04	0.9440	1.4309	1.4753	1.4392
0.06	0.9455	1.4322	1.4757	1.4403
0.08	0.9456	1.4335	1.4760	1.4417
0.10	0.9468	1.4356	1.4763	1.4429
C-3				
0.01	0.9422	1.4293	1.4749	1.4406
0.02	0.9426	1.4290	1.4754	1.4427
0.04	0.9432	1.4308	1.4759	1.4438
0.06	0.9445	1.4313	1.4764	1.4452
0.08	0.9458	1.4326	1.4769	1.4464
0.10	0.9461	1.4338	1.4772	1.4510
C-4				
0.01	0.9429	1.4276	1.4764	1.4446
0.02	0.9431	1.4282	1.4766	1.4457
0.04	0.9443	1.4287	1.4771	1.4471

(Continue)

Table 4. The density (ρ_{12}) and refractive index (n) of chalcones in DMF and chloroform at 303.15 K (*continuation*)

Conc. (M)	ρ_{12} (g.cm ⁻³)	n	ρ_{12} (g.cm ⁻³)	n
DMF			Chloroform	
C-4				
0.06	0.9453	1.4305	1.4775	1.4483
0.08	0.9474	1.4311	1.4779	1.4529
0.10	0.9476	1.4319	1.4781	1.4531
C-5				
0.01	0.9418	1.4292	1.4753	1.4386
0.02	0.9429	1.4299	1.4755	1.4392
0.04	0.9437	1.4311	1.4760	1.4413
0.06	0.9447	1.4323	1.4764	1.4424
0.08	0.9463	1.4334	1.4768	1.4438
0.10	0.9464	1.4345	1.4770	1.4450
C-6				
0.00	0.9422	1.4280	1.4248	1.436
0.01	0.9433	1.4290	1.4754	1.4506
0.02	0.9445	1.4297	1.4757	1.4512
0.04	0.9458	1.4305	1.4762	1.4533
0.06	0.9473	1.4320	1.4766	1.4544
0.08	0.9476	1.4343	1.4771	1.4558
0.10	0.9422	1.4280	1.4773	1.4570
C-7				
0.01	0.9445	1.4276	1.4755	1.4400
0.02	0.9449	1.4278	1.4759	1.4421
0.04	0.9479	1.4281	1.4764	1.4432
0.06	0.9489	1.4288	1.4769	1.4446
0.08	0.9503	1.4303	1.4773	1.4458
0.10	0.9543	1.4308	1.4776	1.4504

(Continue)

Table 4. The density (ρ_{12}) and refractive index (n) of chalcones in DMF and chloroform at 303.15 K (*continuation*)

Conc. (M)	ρ_{12} (g.cm ⁻³)	n	ρ_{12} (g.cm ⁻³)	n
DMF			Chloroform	
C-8				
0.01	0.9434	1.4284	1.4750	1.4382
0.02	0.9471	1.4296	1.4753	1.4403
0.04	0.9479	1.4308	1.4760	1.4414
0.06	0.9491	1.4320	1.4765	1.4428
0.08	0.9507	1.4334	1.4769	1.4440
0.10	0.9516	1.4348	1.4772	1.4486
C-9				
0.01	0.9434	1.4285	1.4755	1.4385
0.02	0.9441	1.4296	1.4760	1.4406
0.04	0.9447	1.4312	1.4764	1.4417
0.06	0.9454	1.4324	1.4772	1.4431
0.08	0.9462	1.4338	1.4785	1.4443
0.10	0.9474	1.4349	1.4788	1.4489

Uncertainties: Density (ρ_{12}): ± 0.0001 g cm⁻³, Refractive index (n): ± 0.0001 .

The density of solution (ρ_{12}) is related to densities of the solvent, solute and their weight fractions g_1 and g_2 according to the equation:

$$\frac{1}{\rho_{12}} = \frac{g_1}{\rho_1} + \frac{g_2}{\rho_2} \quad (1)$$

where ρ_{12} is the density of solution and ρ_1 and ρ_2 are the densities of solvent and solute respectively.

The densities of all the synthesized compounds were evaluated from the slope of plots of $1/g_1\rho_{12}$ versus g_2/g_1 . The inverse of slope gives density of compound (ρ_2). Table 5 shows these calculated densities for all the compounds along with theoretical values evaluated using the following equation [32]:

$$\rho = KM/N_A \sum \Delta V_i \quad (2)$$

Here ρ indicates the density of the compound, K is packing fraction which is equal to 0.599 for organic compounds, M is for molecular weight of the compound, N_A is the Avogadro's number and ΔV_i is the volume increment of the atoms and atomic groups present in the compound. The density of all the studied compounds have been evaluated and reported in Table 5.

Table 5. Experimental and theoretical values of density of synthesized Chalcones.

Compound Code	Experimental density (g.cm ⁻³)		Theoretical density (g.cm ⁻³)
	DMF	CHCl ₃	
C-1	1.3441	1.5408	1.2478
C-2	1.1161	1.5552	1.3513
C-3	1.1287	1.6207	1.2501
C-4	1.1820	1.6287	1.1770
C-5	1.1287	1.6313	1.2510
C-6	1.1534	1.5898	1.2343
C-7	1.3587	1.5924	1.4364
C-8	1.2563	1.5974	1.3417
C-9	1.1274	1.7007	1.3018

The experimental density values are different from those evaluated theoretically. Further, for the same compound, density in the two different solvents is different. This suggests that solvent plays an important role. In solutions, molecular interactions exists which differs with different solvents. These intermolecular interactions differ due to different substitutions in compounds. The presence of these interactions has also been observed in ultrasonic studies discussed above. Due to these interactions, volume changes which causes change in density.

Further, the molar refraction of a pure liquid $(MRD)_1$ can be calculated using the Lorentz-Lorenz equation [33]:

$$(MRD)_1 = \left[\frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \right] \frac{M}{\rho} \quad (3)$$

where n , M and ρ are refractive index, molecular weight and density of pure liquid respectively.

For solutions, the following Eq. (4) was used to determine molar refraction.

$$(\text{MRD})_{12} = \left[\frac{n_{12}^2 - 1}{n_{12}^2 + 1} \right] \left[\frac{X_1 M_1 + X_2 M_2}{\rho_{12}} \right] \quad (4)$$

where n_{12} and ρ_{12} are refractive index and density of solution respectively. X_1 and X_2 are the mole fractions and M_1 and M_2 are the molecular weight of the solvent and solute respectively.

From the values of the molar refraction of solution and pure solvent, molar refraction of solid compounds were determined by following equation:

$$(\text{MRD})_{12} = X_1 (\text{MRD})_1 + X_2 (\text{MRD})_2 \quad (5)$$

From the density and molar refraction data, the refractive indexes of all the compounds were calculated from Eq. (3). The molar refraction $(\text{MRD})_2$ and refractive index of all the compounds are reported in Table 6 for 0.1 M solution.

Table 6. Molar refraction $(\text{MRD})_2$ and refractive index (n) of synthesized Chalcones at 0.1 N solution.

Compound Code	Solvents			
	DMF		CHCl_3	
	$(\text{MRD})_2$	n	$(\text{MRD})_2$	n
C-1	89.16	1.4325	113.69	1.4475
C-2	120.48	1.4356	91.41	1.4429
C-3	100.69	1.4238	123.88	1.4510
C-4	90.43	1.4219	135.60	1.4531
C-5	111.75	1.4245	98.38	1.4450
C-6	115.60	1.4243	165.30	1.4470
C-7	84.03	1.4208	134.06	1.4504
C-8	103.16	1.4248	119.41	1.4486
C-9	107.27	1.4249	112.98	1.4489

Both $(\text{MRD})_2$ and refractive index of compounds are different in each solvent. This again proves that in different solvents intermolecular interactions are different, which affect these parameters. Further, for different compounds, $(\text{MRD})_2$ are quite different whereas refractive index differ only slightly. This suggests that although substitution affect $(\text{MRD})_2$ largely, refractive index only slightly. However, the variation of refractive index of all the compounds in a particular solvent is very less.

Conductance: The measured conductance (k) of each solution was used to determine the specific conductance (κ), which is then used for the calculation of equivalent conductance (λ_c).

The equations used for calculating specific conductance (κ) and equivalent conductance (λ_c) are:

$$\kappa = k\theta \quad (6)$$

$$\lambda_c = 1000 \frac{\kappa}{C} \quad (7)$$

where θ is the cell constant (0.86 cm^{-1}) and c is the concentration (g.equiv./lit.) of solution.

The conductance of solutions of chalcone compounds in both the solvents is listed in Table 7.

Table 7. The conductance* (mmho) of chalcones in DMF and chloroform at 303.15 K.

Conc. M	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
DMF									
0.000	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35
0.001	6.38	5.11	3.52	2.79	3.02	3.73	2.78	3.15	2.61
0.002	6.50	5.86	3.72	3.10	3.58	4.22	3.00	3.46	2.92
0.004	6.66	7.25	4.12	4.27	4.24	4.93	3.54	4.25	3.78
0.006	6.76	8.34	4.51	5.19	4.82	5.99	4.10	5.43	4.75
0.008	6.93	9.12	4.92	6.27	5.23	6.88	4.71	6.86	5.84
0.010	7.09	10.10	5.52	7.57	5.75	8.04	5.57	8.14	7.34
0.020	8.64	11.98	6.98	9.69	8.03	10.11	7.80	11.24	9.69
0.040	11.22	14.03	8.35	12.38	11.27	12.59	9.37	13.26	11.55
0.060	13.57	15.73	9.99	14.26	13.91	14.76	10.38	15.34	13.27
0.080	15.67	17.27	11.54	16.07	16.21	16.87	11.79	17.07	14.55
0.100	18.07	18.32	13.34	17.18	18.31	18.27	13.57	18.65	15.62
Chloroform									
0.000	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120
0.001	0.140	0.130	0.320	0.240	0.270	0.440	0.360	0.382	2.7004

(Continue)

Table 7. The conductance* (mmho) of chalcones in DMF and chloroform at 303.15 K. (*continuation*)

Conc. M	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
Chloroform									
0.002	0.150	0.140	0.330	0.250	0.280	0.452	0.520	0.512	2.1113
0.004	0.180	0.170	0.360	0.280	0.310	0.480	0.800	0.660	1.5760
0.006	0.210	0.200	0.390	0.310	0.340	0.510	1.080	1.000	1.7085
0.008	0.240	0.230	0.420	0.340	0.370	0.540	1.411	1.112	1.6372
0.010	0.260	0.280	0.472	0.390	0.420	0.590	1.790	1.340	1.5308
0.020	0.310	0.300	0.490	0.410	0.440	0.610	2.750	2.040	1.3029
0.040	0.330	0.320	0.510	0.430	0.460	0.630	3.710	2.950	0.9073
0.060	0.370	0.375	0.550	0.470	0.547	0.670	4.890	3.200	0.7052
0.080	0.410	0.460	0.590	0.510	0.675	0.710	6.250	4.320	0.5988
0.100	0.470	0.470	0.640	0.570	0.761	0.760	7.280	4.450	0.4911

*Uncertainty in conductance is ± 0.02 mmho.

It is observed that for all the compounds, conductance increases with concentration. Further, conductance is lower in chloroform than that in DMF.

Figure 4 shows the variation of equivalent conductance with concentration in both DMF and chloroform solutions.

In both cases, usually equivalent conductance (λ_c) increases with dilution. However, for certain compounds in both DMF (C-9) and chloroform (C-2), λ_c do not increase continuously but bend downward at low concentrations. This typical behavior may be due to interactions within the molecule thereby causing constriction within the molecule or due to association between compound molecules with solvent molecules. Further, it is evident from these figures that most of the compounds behave as weak electrolytes whereas some of them exhibited slightly strong electrolytic behavior. Further, behavior is different in different solvents.

So for few compounds, λ_0 value can be evaluated by extrapolation of plot of λ_c versus $\sqrt{C}$. However, for the solutions where λ_c decreases at low concentrations, λ_0 could not be weak electrolytes, it is difficult to determine λ_0 . There is an alternate procedure also to determine λ_0 using the following equation [34]:

$$k = k_0 + \lambda_0 c + c\phi_{(c)} \quad (8)$$

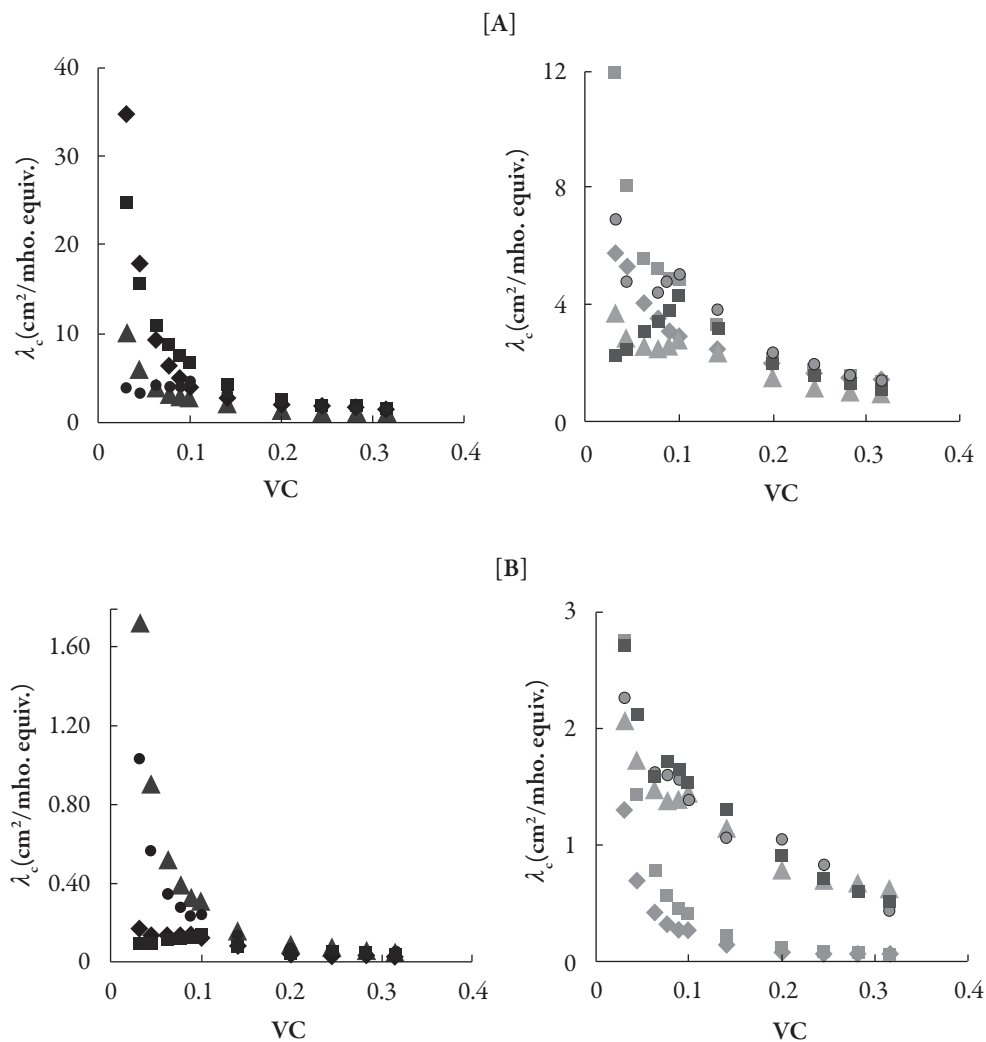


Figure 4. The variation of equivalent conductance with square root of concentration for compounds in [A] DMF and [B] Chloroform at 303.15 K. ♦: C-1. ■: C-2. ▲: C-3. ●: C-4. ◆: C-5. ▣: C-6. ▲: C-7. ●: C-8. ▣: C-9.

where k and k_0 are the electrolytic conductivity of the solutions and solvent respectively. C is the equivalent concentration and the function Φ_1 denotes the effect of inter-ionic interactions.

The limiting conductivity can be evaluated accurately from the limiting slope of smaller linear portions of the curve of k versus c , provided other derivatives (dk_0/dc)

and $d[c\Phi]/dc$ in differential form of equation (8) are neglected as compared to λ_0 , which can be determined from differential form of equation (8) is:

$$\frac{dk}{dc} = \frac{dk_0}{dc} + \lambda_0 + \frac{d[c\Phi_{(c)}]}{dc} \quad (9)$$

These λ_0 values are reported in Table 8 along with those determined by extrapolation. For the systems where λ_C decreases at low concentrations, λ_0 could not be evaluated.

Table 8. The limiting equivalent conductance λ_0 ($\text{mho cm}^2.\text{equi}^{-1}$) of studied compounds in DMF and Chloroform at 303.15 K.

Compound Code	Solvents			
	DMF		CHCl_3	
	λ_0 from graph	λ_0 from eq.	λ_0 from graph	λ_0 from eq.
C-1	-	2.86	0.161	0.161
C-2	-	6.77	-	0.156
C-3	1.94	2.64	-	0.258
C-4	-	5.18	-	0.214
C-5	7.12	3.23	-	0.230
C-6	-	5.16	-	0.032
C-7	4.91	3.05	2.88	0.160
C-8	-	5.61	-	0.113
C-9	-	4.92	-	0.175

From Table 8, it is observed that in both the solvents, calculated values of limiting equivalent conductance (λ_0) are in fair agreement with those evaluated graphically suggesting thereby that equation (8) can be used for the studied systems. However, for some cases, deviations are significant suggesting thereby that equations (8) and (9) are not valid for these systems. The deviation may be due to the fact that in equations (8) and (9), inter ionic interactions are ignored which may play an important role in these systems.

Partition coefficient: The $\log P$ values for the studied compounds at different pH are given in Table 9. The $\log P$ value depends upon the hydrophilic and hydrophobic character of compounds and has inverse relation with hydrophilicity of compounds.

Table 9. Log *P* values of chalcones.

Compounds code	Max. absorption Wavelength/nm	Log <i>P</i>				
		Water	0.1 N HCl	6.0 pH	7.4 pH	8.0 pH
C-1	371	0.724	0.883	0.876	1.767	1.681
C-2	358	0.785	1.164	0.798	0.860	0.755
C-3	359	1.647	1.113	1.511	1.972	1.370
C-4	382	0.923	2.092	1.439	1.967	1.314
C-5	383	1.621	0.626	1.267	2.011	1.906
C-6	365	2.128	1.891	1.993	1.722	2.090
C-7	360	2.768	2.370	0.068	1.893	2.592
C-8	359	2.027	1.940	1.619	1.583	1.867
C-9	365	1.537	1.003	1.401	1.861	1.259

The variation of log *P* with pH for all the studied compounds is also shown in Figure 5.

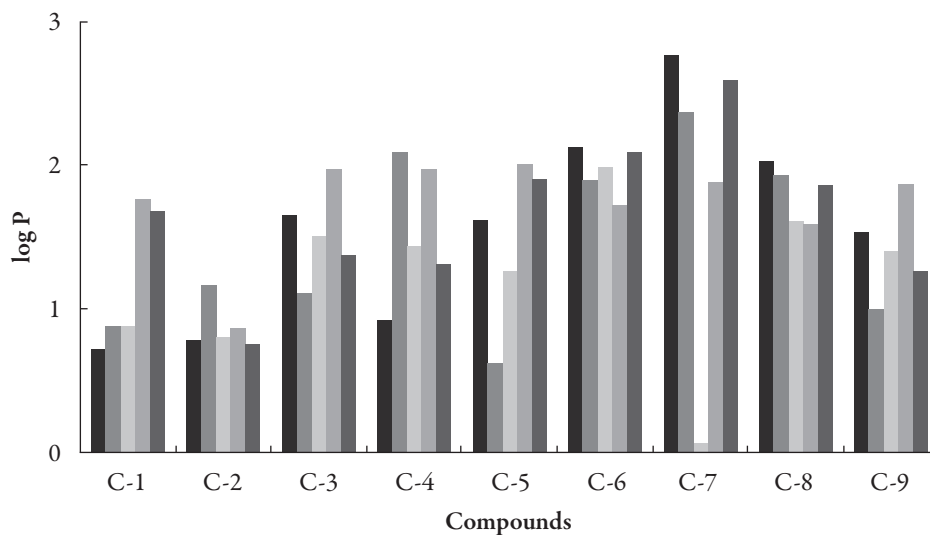


Figure 5. The variation of log *P* for studied compounds with pH. ■: water; ■: 0.1 N HCl; ■: 6.0 pH; ■: 7.4 pH; ■: 8.0 pH.

The selected pH values were due to their existence in human body. As HCl exists in gastric juice in stomach, 0.1 N HCl is taken. Blood has 7.4 pH, so the study is done at pH 7.4. Further, the middle and upper range of body pH is 6.0 and 8.0 respectively, so

study was done at these all pH also. It is clear from Figure 7 that $\log P$ is maximum for SNC-7 suggesting thereby hydrophobic nature of this compound whereas SNC-1 is highly hydrophilic as its $\log P$ is minimum.

All the studied compounds have the same central moiety but different side chains i.e, substituents, as shown in Table 1. Thus the hydrophobic or hydrophilic character of a compound depends not only on pH but also on substituent. As reported in Table 1, C-7 contains hydroxyl group at para position whereas C-1 has chloro group at para position. Thus, the presence of hydroxyl group increases the hydrophobicity (as in C-7) in comparison to chloro group (as in C-1).

However, the hydrophilic or hydrophobic nature of chalcone compounds varies with pH. In 0.1 N HCl, again C-7 is highly hydrophobic whereas C-5 containing 4-methoxy group is found to be hydrophilic. Thus, in gastric juice, C-7 will not be absorbed whereas C-5 can be easily absorbed.

At pH 6.0, $\log P$ is maximum for C-6 containing 4-bromo group whereas 4-hydroxy group containing C-7 has lowest value of $\log P$. Thus, at this pH, C-6 exhibits maximum hydrophobicity whereas C-7 is most hydrophilic. It means that in blood, C-7 can be easily absorbed.

At pH 7.4, among all these compounds, C-2 containing 4-nitro group has minimum $\log P$ whereas maximum is observed for C-5 containing 4-methoxy group. Thus, C-5 will not be absorbed in blood and is less likely to spread in the body. However, it is more likely to accumulate in fatty tissues [35, 36].

When pH is 8.0, maximum and minimum $\log P$ values are exhibited by C-7 and C-2 respectively. Thus, again in alkaline pH, C-7 will not be absorbed in blood but can be accumulated in fatty tissues [35, 36].

Thus, it is concluded that the position of functional group is also important in the hydrophobic-hydrophilic character of the compound. Overall observation shows that C-7 exhibited hydrophobic character in neutral, acidic and alkaline systems although it contains hydroxyl group.

Dissociation constant: The dissociation constants or pK_a of studied compounds are determined from the plot of absorbance versus pH.

Table 10 shows the pK_a values for the studied compounds. It is observed that substitution group affects the dissociation constant as expected. Table 1 shows different substitutions in studied chalcones. The presence of bromo group at para position causes C-6 most basic whereas due to hydroxyl group at para position, C-7 is most acidic. The two

dissociation constants in C-7 are due to two replaceable hydrogen. This is in agreement with the reported results of increase of acidic character of compounds due to presence of hydroxyl group [37-39].

Table 10. The pK_a values for the studied chalcone compounds.

Compound Code	Average pK_a
C-1	9.45
C-2	9.59
C-3	9.12
C-4	9.22
C-5	8.87
C-6	9.69
C-7	5.57 8.56
C-8	8.76
C-9	8.96

CONCLUSION

It is concluded that physicochemical properties of a compound depends on its structure and solvents in which it is dissolved. For compounds having same central moiety, nature of substitution plays an important role in solution due to which interactions changes in different solvents thereby affecting properties. Further, position of substitution in a compound also affects physicochemical properties.

DISCLOSURE STATEMENT

A la Universidad Nacional de Colombia.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. L. Ni, C.Q. Meng, J.A. Sikorski, Recent advances in therapeutic chalcones, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **14**, 1669 (2004).
2. N.K. Sahu, S.S. Balbhadra, J. Choudhary, D.V. Kohli, Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: A review, *Curr. Med. Chem.*, **19**, 209 (2012).
3. N.S. Rao, A.B. Shaik, S.R. Routhu, S.M. Ali Hussaini, S. Sunkari, A.V. Subba Rao, A. Malla Reddy, A. Alarifi, A. Kamal, New quinoline linked chalcone and pyrazoline conjugates: Molecular properties prediction, antimicrobial and anti-tubercular activities, *Chem. Select*, **2**(10), 2989 (2017).
4. N.J. Lawrence, R.P. Patterson, L.L. Ooi, D. Cook, S. Ducki, Effect of α -substitutions on structure and biological activity of anti-cancer chalcones, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**(22), 5844 (2006).
5. J.H. Jeon, S.J. Kim, C.J. Kim, J.K. Kim, J.G. Jun, Synthesis of biologically active chalcones and their anti-inflammatory effects, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **33**(3), 953 (2012).
6. J. Syahri, K. Rullah, R. Armunanto, E. Yuanita, B.A. Nurohmah, M.F. Fasihi, M. Aluwi, L.K. Wai, B. Purwono, Synthesis, biological evaluation, QSAR analysis and molecular docking of chalcone derivatives for anti-malarial activity, *Asian Pacif. J. Tropical Dis.*, **7**(1), 8 (2017).
7. T. Yamamoto, M. Yoshimura, F. Yamaguchi, T. Kouchi, R. Tsuji, M. Saito, A. Obata, M. Kikuchi, Anti-allergic activity of naringenin chalcone from a tomato skin extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1706 (2004).
8. H. Niu, W. Wang, J. Li, Y. Lei, Y. Zhao, W. Yang, C. Zhao, B. Lin, S. Song, S. Wang, A novel structural class of coumarin-chalcone fibrates as PPAR α/γ agonists with potent antioxidant activities: Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies, *Eur. J. Med. Chem.*, **138**, 212 (2017).
9. D.K. Mahapatra, S.K. Bharti, V. Asati, Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives, *Eur. J. Med. Chem.*, **101**, 496 (2015).
10. F. Shi, H. Fang, W. Xu, Design, synthesis and biological activity of novel chalcone derivatives as anti-influenza agents, *Chem. Res. Chin. Univ.*, **32**(1), 28 (2016).

11. M. Chen, S.B. Christensen, J. Blom, E. Lemmich, L. Nadelmann, K. Fich, T.G. Theander, A. Kharazmi, Licochalcone, A novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 2550 (1993).
12. D. Israf, T. Khaizurin, A. Syahida, N. Lajis, S. Khozirah, Cardamonin inhibits COX and iNOS expression via inhibition of p65NF-kappa-B nuclear translocation and I-kappa-B phosphorylation in RAW 264.7 macrophage cells, *Mol. Immunol.*, **44**, 673 (2007).
13. D.W. Kim, M.J. Curtis-Long, H.J. Yuk, Y. Wang, Y.H. Song, S.H. Jeong, K.H. Park, Quantitative analysis of phenolic metabolites from different parts of *Angelica keiskei* by HPLC–ESI MS/MS and their xanthine oxidase inhibition, *Food Chem.*, **153**, 20 (2014).
14. D. Maydt, S. De Spirt, C. Muschelknautz, W. Stahl, T.J.J. Muller, Chemical reactivity and biological activity of chalcones and other α , β -substituted carbonyl compounds, *Xenobiotica*, **43**(8), 711 (2013).
15. D. Jandial, A. Danielle, C. Blair, S. Zhang, S.L. Krill, Y.B. Zhang, X. Zi, Molecular targeted approaches to cancer therapy and prevention using chalcones, *Curr. Cancer Drug Targets*, **14**, 181 (2014).
16. M.S. Shah, S.U. Khan, S.A. Ejaz, S. Afridi, S.U.F. Rizvi, N. Haq, J. Iqbal, Cholinesterases inhibition and molecular modeling studies of piperidyl-thienyl and 2-pyrazoline derivatives of chalcones, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **482**(4), 615 (2017).
17. S. Wieslaw, G. Grzegorz, R. Aleksandra, Isoflavones, their glycosides and glyco conjugates. Synthesis and biological activity, *Curr. Org. Chem.*, **21**(3), 218 (2017).
18. B. Zhou, C. Xing, Diverse molecular targets for chalcones with varied bioactivities, *Med. Chem.*, **5**, 388 (2015).
19. V. Ramkumar, S. Anandhi, P. Kannan, R. Gopalakrishnan, Substitution effect on chalcone based materials for corrosion and photo cross linking applications, *RSC Adv.*, **5**, 586 (2015).
20. D. Tielas, E. Graña, M.J. Reigosa, A.M. Sánchez-moreiras, Biological activities and novel applications of chalcones, *Planta Daninha*, **34**(3), 607 (2016).
21. P. Singh, A. Anand, V. Kumar, Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review, *Eur. J. Med. Chem.*, **85**, 758 (2014).

22. G.P. Rao, P. Kumar, M. Singh, H.N. Singh, O.P. Pandey, Efficacy of chalcone, hydrazide and oxadiazole derivatives against fungal pathogens of sugarcane, *Sugar Cane*, **5**, 17 (1994).
23. S. Gafner, J.L. Wolfender, S. Mavi, K. Hostettmann, Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica serrate*, *Planta Medica*, **62**, 67 (1996).
24. J.A. González, A. Estévez-Braun, Effect of (E)-chalcone on potato-cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G.rostochiensis*), *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1163 (1998).
25. J.S. Lee, S.N. Bukhari, N.M. Fauzi, Effects of chalcone derivatives on players of the immune system, *Drug Des. Devel. Ther.*, **9**, 4761 (2015)
26. M. Satyanarayana, P. Tiwari, B.K. Tripathi, A.K. Srivastava, R. Pratap, Synthesis and anti hyper glycaemic activity of chalcone based aryl oxypropanolamines, *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 883 (2004).
27. J. Prabhu, K.Velmurugan, A. Raman, N. Duraipandy, M.S. Kiran, S. Easwaramoorthi, R. Nandha Kumar, A simple chalcone based ratiometric chemosensor for sensitive and selective detection of Nickel ion and its imaging in live cells, *Sens. Actuat. B: Chem.*, **238**, 306 (2017).
28. P.T. Sowmya, K.M.L. Rai, Synthesis and characterization of new homologous series of un-symmetrical liquid crystalline compounds based on chalcones and 3,5-disubstituted isoxazoles, *J. Chem. Sci.*, **129**, 67 (2017).
29. H. L. Qin, Z. P. Shang, I. Jantan, O. U. Tan, M. A. Hussain, M. Sher, S. N. A. Bukhari, Molecular docking studies and biological evaluation of chalcone based pyrazolines as tyrosinase inhibitors and potential anticancer agents, *RSC Adv.*, **5**, 46330 (2015).
30. P. Shukla, M. Satyanarayana, P.C. Verma, J. Tiwari, A.P. Dwivedi, R. Srivastava, N. Rehuja, S.P. Srivastava, S. Gautam, A.K. Tamrakar, A.K. Dwivedi, H.N. Kushwaha, N. Gautam, S.K. Singh, M. Srivastava, C. Nath, R. Raghubir, A.K. Srivastava, R. Pratap, Chalcone-based aryloxypropanolamine as a potential anti-diabetic and antidyslipidaemic agent, *Curr. Sci.*, **112**, 1675 (2017).
31. J.A. Riddick, W.B. Bunger, T. Sakano, "Organic Solvents-Physical Properties and Methods of Purification", Techniques of Chemistry, John Wiley & Sons, New York, 1986.
32. G.L. Slonimskii, A.A. Askadshii, A.I. Kitaigorodskii, The packing of polymer molecules, *Vysokomol. Soyed*, **12 A**, 494 (1970).

33. H.A. Lorentz, Lorentz, Theory of electronics, Leipzig, 1906.
34. B.B. Prasad, A. Kumar, M. Singh, S. Singh, Electrical conductivity of crystal violet based quaternary ammonium polyelectrolytes in propylene carbonate and sulfolane, *J. Chem. Eng. Data*, **40**, 79 (1995).
35. E.S. Rowe, F. Zhang, T.W. Leung, J.S. Parr, P.T. Guy, Thermodynamics of membrane partitioning for a series of n-alcohols determined by titration calorimetry: Role of hydrophobic effect, *Biochem.*, **37**(8), 2430 (1998).
36. M. Fresta, S. Guccione, A.R. Beccari, P.M. Furneri, G. Puglisi, Combining molecular modeling with experimental methodologies: Mechanism of membrane permeation and accumulation of ofloxacin, *Bioorg. Med. Chem.*, **10**(12), 3871 (2002).
37. C. Ogretir, S. Yaligan, S. Demirayak, Spectrophotometric determination of acid dissociation constant of some biologically active 6-phenyl-4,5-dihydro-3(2H)-pyridazinone derivatives, *J. Chem. Eng. Data*, **47**, 1396 (2002).
38. C. Ogretir, S. Demirayakand, N.T. Funda, Spectroscopic determination of acid dissociation constant of some pyridyl-substituted 2-aminothiazole derivatives, *J. Chem. Eng. Data*, **51**, 946 (2006).
39. H. Berber, C. Ogretir, E. Ermis. Spectroscopy determination of acidity constant of some monoazo resorcinol derivatives, *J. Chem. Eng. Data*, **53**, 1049 (2008).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Sh. Baluja, N. Vakariya, A. Hirapara, Synthesis and physicochemical studies of vanillin chalcones, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(2), 185-215 (2018).

Evaluación del impacto ambiental del proceso de modificación química de almidones nativos como potenciales excipientes en la industria cosmética

Melissa Soledad Caro Soto^{1*}, Miladys Esther Torrenegra Alarcón^{2*}, María del Rosario Osorio Fortich^{1**}, Glicerio León Méndez^{2**}, Nerlis Paola Pajaro³

¹ Grupo de Investigación en Tecnología Farmacéutica, Cosmética y de Alimentos (GITFCA), Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena, Bolívar, Colombia.

*Correo electrónico: mescas19@hotmail.com.

**Correo electrónico: mosoriof@unicartagena.edu.co.

² Grupo de Investigación de Biotecnología e Innovación (GIBEI), Centro de Comercio y Servicios, regional Bolívar (SENA), Ternera Km. 1 vía Turbaco CTG, Cartagena, Bolívar, Colombia.

*Correo electrónico: mtorrenegraa@sena.edu.co.

**Correo electrónico: gleonm1@unicartagena.edu.co.

³ Grupo de Ciencias Médicas y Farmacéuticas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Sucre, calle 16B No. 13B-80, barrio La Pajuela, sede Puerta Blanca, Sincelejo, Sucre, Colombia. Correo electrónico: nerlis.pajaro@unisucra.edu.co.

Recibido para evaluación: 23 de agosto de 2017

Aceptado para publicación: 8 de marzo de 2018

RESUMEN

El almidón por ser un polímero natural biodegradable es utilizado en la industria cosmética, gracias a que posee un bajo impacto ambiental. Para mejorar las propiedades anfifílicas de este polímero, se introduce una cadena alifática en la estructura, que permita interactuar con las cadenas apolares del almidón, generando así un aumento de su capacidad lipofílica. Por tanto, en este trabajo se usaron almidones de ñame, yuca, batata y maíz USP, este último como referencia, y fueron sometidos a tres metodologías de modificación: 1. Esterificación directa, 2. Hidrólisis y posterior esterificación y 3. Esterificación mediante microondas, empleando anhídrido dodecenil succínico (DDSA). En todos los casos, se incrementó significativamente la capacidad captadora de aceite y la emulsificante (tensoactiva) de los almidones; sin embargo, el “método en microondas”

presentó algunas ventajas en comparación con otros métodos, de las cuales destacamos: aumento de la eficiencia de esterificación, disminución del tiempo de reacción de esterificación y menor impacto ambiental.

Palabras clave: huella de carbono, cosmética, almidón, impacto ambiental.

SUMMARY

Evaluation of the environmental impact of the process of chemical modification of native starches as potential excipients in the cosmetic industry

Starch, as a biodegradable natural polymer, is used in the cosmetic industry, exhibiting a low environmental impact. To improve the amphiphilic properties of this polymer, an aliphatic chain is introduced in the structure, which allows interacting with the polar chains of the starch, generating an increase of its lipophilic capacity. Therefore, in this paper we evaluated starches of yam, cassava, sweet potato and corn USP (as reference), which were subjected to three chemical modification methodologies: 1. Direct esterification; 2. Hydrolysis and esterification; 3. Esterification by microwaves, by using dodecenyl succinic anhydride (DDSA). In all cases significant increasing of the oil capturing capacities and emulsifier (active) of the starches. However, the “microwave method” presented some advantages compared to other methods, in particular, an increase in esterification efficiency, a decrease in the esterification reaction time and a lower environmental impact.

Key words: Carbon footprint, cosmetics, starch, environmental impact.

INTRODUCCIÓN

Existe gran variedad de almidones nativos extraídos de diferentes fuentes naturales, tal es el caso de los tubérculos como la batata, yuca y ñame, que presentan gran importancia socioeconómica en la región Caribe colombiana [1], especialmente en el departamento de Sucre [2, 3]. Los almidones nativos son utilizados en diferentes industrias, por ejemplo, para recubrimientos, textiles, aglutinantes, absorbentes, entre otros. Sin embargo, el uso del almidón sin modificar es limitado debido a su fragilidad, deterioro de sus propiedades mecánicas a condiciones ambientales por la exposición con la humedad, la reducida procesabilidad por su alta viscosidad, así como su incompatibilidad con algunos solventes y polímeros [4-7]. Gracias a las distintas limitaciones que pueden presentar los almidones en cuanto a sus propiedades mecánicas, químicas y a su alta degradabilidad,

se pueden efectuar varias modificaciones fundamentalmente en tres categorías: físicas, químicas y enzimáticas; se cuenta también con la posibilidad de combinarlas para mejorar su comportamiento y luego ser evaluadas por metodologías apropiadas con el fin de determinar su aplicabilidad en el campo industrial, dando valor agregado a un producto nativo utilizable en aplicaciones específicas industriales [7-10]. Existe poca información respecto a las propiedades físicas, químicas y reológicas de los almidones nativos y modificados colombianos, por lo cual es necesario estudios para generar tal información, y proponer alternativas de uso para estos recursos. La extracción y caracterización del almidón nativo proveniente de diferentes fuentes no convencionales (almidones nativos latinoamericanos), y sus posteriores modificaciones químicas, pueden proveer materias primas con propiedades especiales para su uso en la industria cosmética; por tal motivo, se habla de modificación de almidones nativos como un valor agregado para su posible uso como excipientes, donde su competencia estaría basada en las características funcionales que ofrecen estos almidones modificados [10-12]. No obstante, todos estos procesos químicos han contribuido al aumento en las concentraciones de CO₂ en la atmósfera, transformándose en el principal factor responsable de la intensificación del efecto invernadero y el cambio climático resultante. Sin embargo, para disminuir esta problemática mundial, se han establecido parámetros como la “huella de carbono”, que es una medida de las cantidades de emisiones generadas de carbono equivalente [13]. Estas emisiones son generadas a partir de las materias primas, consumo eléctrico, consumo de combustible y el proceso productivo del producto. Es de gran importancia crear herramientas para obtener estos indicadores, ya que a partir del cálculo de las emisiones las industrias podrán ser conscientes de su impacto ambiental, siendo una alternativa para un control acerca de los procesos y procedimientos de la organización, además permite analizar la línea productiva, conocer qué puntos son los mayores generadores y plantear posibles soluciones al respecto [13]. Por lo anterior, este trabajo se basó en evaluar el impacto ambiental del proceso de modificación química de almidones nativos como potenciales excipientes en la industria cosmética.

METODOLOGÍA

El almidón se obtuvo de los tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata* P.), batata (*Ipomoea batatas*) y yuca (*Manihot esculenta*). Para el caso del ñame y la batata, estos se compraron en el municipio de San Juan Nepomuceno, ubicado en el norte del departamento de Bolívar (9° 37' latitud norte y 74° 15' longitud oeste) y en cuanto a la yuca se obtuvo en el municipio de Corozal, ubicado en el noreste del departamento de Sucre (09° 19' latitud norte y 75° 18' longitud este). Se adquirieron en una parcela particular 20 kilogramos de material vegetal fresco, entero, sin señales de deterioro y en estado de madurez para consumo humano.

Etapas 1. Obtención del almidón

El proceso de extracción del almidón corresponde al método convencional: inicia con el descortezado; luego se realizó un troceado y licuado con agua potable para obtener una lechada, esta se filtró a través de una tela para eliminar las fibras de celulosa. El filtrado se dejó en reposo y después se decantó, el sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó con agua desionizada y se filtró al vacío, se secó a 50 °C por 24 horas, luego se molió y, finalmente, se empacó en recipientes herméticos. Aproximadamente, el 10% de almidón seco se obtuvo a partir del material vegetal [4-6].

Etapas 2. Modificación química del almidón

Método 1. Método de esterificación directa (E-10)

Una suspensión de almidón nativo a 25 °C (40 g de almidón en 100 mL de agua desionizada) se ajustó a pH 8,5 con NaOH 3% con agitación constante por 30 minutos. Se agregaron 10 mL de anhídrido dodecenil succínico (DDSA) [14], gota a gota para alcanzar un nivel de sustitución. Debido a que durante la reacción el pH de la solución tiende a descender, este se mantuvo entre 8,5 y 9,0 con pequeñas adiciones de NaOH 3% durante 24 horas. Una vez que el reactivo límite se terminó, esto es, cuando el pH no descende más, la solución se ajustó a un valor de 6,5 con HCl al 10%. El material se lavó tres veces con agua desionizada, se secó a 50 °C por 24 horas.

Método 2. Método de hidrólisis y posterior esterificación (H-E 10)

Hidrólisis: a una suspensión de almidón nativo (40 g de almidón en 100 mL de agua desionizada) se añadió 3,4 g de ácido clorhídrico, con agitación constante por 6 horas; manteniendo la temperatura en 50 °C. Cumplido el tiempo, se neutralizó el sistema con NaOH al 10% hasta pH 6,5; se filtró al vacío y el residuo se lavó cuatro veces con agua destilada, se secó a 50 °C por 24 horas y, finalmente, el almidón hidrolizado obtenido se molió y se almacenó en bolsas plásticas herméticas hasta su uso [6].

Esterificación (lipofilización): una suspensión de almidón hidrolizado a 25 °C (40 g de almidón en 100 mL de agua desionizada) se ajustó a pH 8,5 con NaOH 3% con agitación constante por 30 minutos. Se agregaron 10 mL de anhídrido dodecenil succínico (DDSA) diluido en 75 mL de etanol 96%, para alcanzar un nivel de sustitución [6]. Debido a que durante la reacción el pH de la solución tiende a descender, este se mantuvo entre 8,5 y 9,0 con pequeñas adiciones de NaOH 3%. Una vez que el reactivo límite se terminó, esto es, cuando el pH no descende más (4 horas), la suspensión se ajustó a un valor de 6,5 con HCl al 10%. El material se lavó tres veces con agua desionizada, se secó a 50 °C por 24 horas [6].

Método 3. Método de esterificación realizada en horno microondas (MW 10)

Una suspensión de almidón nativo a 25 °C (40 g de almidón en 100 mL de agua desionizada) se ajustó a pH 8,5 con NaOH 3% con agitación constante. Se agregaron 10 mL de anhídrido dodecenil succínico (DDSA), luego se introdujo en un horno microondas convencional (marca Samsung, Estados Unidos), con una potencia del 1,2 kW; las reacciones se llevaron a cabo empleando 3 ciclos de 2 minutos y 1 ciclo de 1 minuto usando la misma potencia. Cabe resaltar que entre cada ciclo se agitaba su contenido por períodos menores de 40 segundos. Cumplidos todos los ciclos de reacción, la suspensión se ajustó a un valor de 6,5 con HCl al 10%. El material se lavó tres veces con agua desionizada, se secó a 50 °C por 24 horas [15].

Etapas 3. Determinación del porcentaje de sustitución (PS)

El PS representa el número promedio de grupos hidroxilos sustituidos por mol de anhidroglucosa (AG). El PS de los almidones succinatados se determinó por titulación ácido-base, toda vez que el residuo de ácido dodecenil succínico unido a la cadena de almidón, posee un grupo carboxílico libre. Se pesaron 5 g de almidón modificado en un beaker de 50 mL, a los que se adicionaron 25 mL de solución de HCl 0,01 N; para asegurar que los residuos se encontraran protonados (remineralización). Esta suspensión se agitó durante 30 minutos. La suspensión se filtró y la torta húmeda se lavó con agua desionizada hasta que no se detectaron cloruros en el agua de lavado (utilizando solución de AgNO₃ 0,1 N). La torta húmeda se transfirió cuantitativamente a un vaso precipitado de 900 mL, añadiendo 100 mL de agua desionizada con posterior agitación. A continuación, se incorporaron 200 mL de agua desionizada a ebullición. La solución se colocó en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos, después de enfriada, y con adición de 2-3 gotas de fenolftaleína al 1% como indicador, se tituló con NaOH 0,01 N [4-6]. El PS se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%PS = \frac{C \times V \times 162}{W \times 1000 \times 3} \times 100$$

Donde:

C = normalidad de la solución de NaOH utilizada durante la titulación.

V = volumen consumido de la solución de NaOH.

W = peso de la muestra analizada.

162 = es el peso molecular de la unidad AG.

3 = es el número de hidroxilos presentes en cada unidad de AG.

Etapla 4. Absorción de aceite

Para la determinación de la capacidad de absorción de aceite, se tomó 1 g de cada almidón y se mezcló con 10 mL de aceite durante 30 segundos, con la ayuda de una varilla de vidrio. Las muestras se dejaron en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos y se midió el volumen del aceite sobrenadante en una probeta de 10 mL [4-6]. Los resultados se expresaron como el porcentaje de aceite retenido por el almidón

Etapla 5. Capacidad emulsificante de los almidones modificados

Se mezcló 1 g de almidón con 25 mL de agua a 25 °C, y se agitó manualmente durante 15 minutos; luego se mezcló esta suspensión con 25 mL de una sustancia oleosa (aceite de maíz, aceite mineral, isopropilmiristato, eutanol G®, aceite de soya, aceite de oliva, aceite de girasol), con ayuda de un homogeneizador Ultra Turrax IKA T10 a 1.300 rpm por 3 minutos y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 24 horas, al cabo de las cuales, se midió la cantidad de emulsión remanente (ER) [4-6]. Esta se expresó en términos de porcentaje, como volumen de la capa emulsificada (VCE) con respecto al total del líquido (VTL) empleando la siguiente expresión:

$$ER = \frac{VCE}{VTL} \times 100$$

Etapla 6. Determinación de la “huella de carbono”

Para determinar la “huella de carbono” se utilizó el estándar Public Available Specification 2050:2011 (PAS 2050) desarrollado por la British Standard Institution (BSI) y se tomó como unidad funcional del estudio 40 g de almidón nativo. En primer lugar, se estableció el límite del estudio, el cual va desde la puerta hasta la puerta y el límite operacional con el fin de realizar una adecuada identificación de las fuentes emisoras de gases de efecto invernadero (GEI) en cada uno de los procesos de modificación de almidones, teniendo en cuenta las emisiones indirectas expresadas en el alcance 2 (consumo de electricidad). Seguidamente, se recopilieron los datos de actividad de cada una de las operaciones y se buscaron los factores de emisión adecuada [16].

Para el caso del consumo de electricidad (CE) expresada en kWh, se tuvieron en cuenta los siguientes pasos:

1. Conocer la potencia eléctrica del motor monofásico en la placa del equipo.
2. Convertir la potencia si se encuentra en HP a kW (1 HP equivale a 0,75 kW).

3. Determinar las horas de operación de los equipos en cada proceso de la unidad de producto que se analiza.
4. Multiplicar la potencia de kW $\times$ horas de operación para obtener el CE y convertir a MW (1.000 kW equivale 1 MW).

Una vez se llevaron a cabo los pasos anteriores, el cálculo de la huella de carbono se realizó empleando la expresión:

$$\text{Huella de carbono} = \text{dato de actividad} \times \text{factor de emisión}$$

Donde, el factor de emisión utilizado para el CE en Colombia se obtuvo del informe de enero de 2015 de la Unidad de Planeación Minero Energética – Colombia.

Cabe resaltar que para efectos de este cálculo, no se tuvo en cuenta las emisiones derivadas del cultivo de las materias primas (yuca, batata y ñame) ni de la instalación y eliminación de los equipos, debido a que no se detectaron fugas de los equipos durante la modificación de los almidones nativos.

Etapas 7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para cada uno de los almidones bajo estudio, fueron recolectados y comparados mediante evaluación estadística, según los comportamientos observados para materiales de referencia, tales como el almidón de maíz. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, siguiendo los protocolos establecidos anteriormente y presentados como la media $\pm$ error estándar. Los resultados obtenidos se sometieron a análisis de varianza ANOVA, seguido de la prueba de Dunnet para determinar las diferencias significativas, las cuales fueron consideradas significantes para un valor de $p < 0,05$. Los datos se ordenaron empleando el programa MS Excel 365, y los análisis estadísticos se hicieron con el paquete GraphPad Prisma V 5.0.

RESULTADOS

El grado de sustitución (GS) es el que permitirá establecer una comparación cuantitativa entre los métodos de modificación convencional y en microondas. El GS representa el número de grupos hidroxilos sustituidos dentro de la estructura del almidón por unidad de anhidroglucosa. Los resultados muestran que todos los almidones se sustituyeron de manera muy similar, alcanzando valores de sustitución que oscilan entre el 0,25% y el 0,47%, siendo unos valores muy por debajo de lo permitido por la U.S. F.D.A., el cual tiene un máximo del 3%, por tratarse de un material empleado en la industria alimenticia [5, 17]. Esto se puede apreciar más claramente en la figura 1.

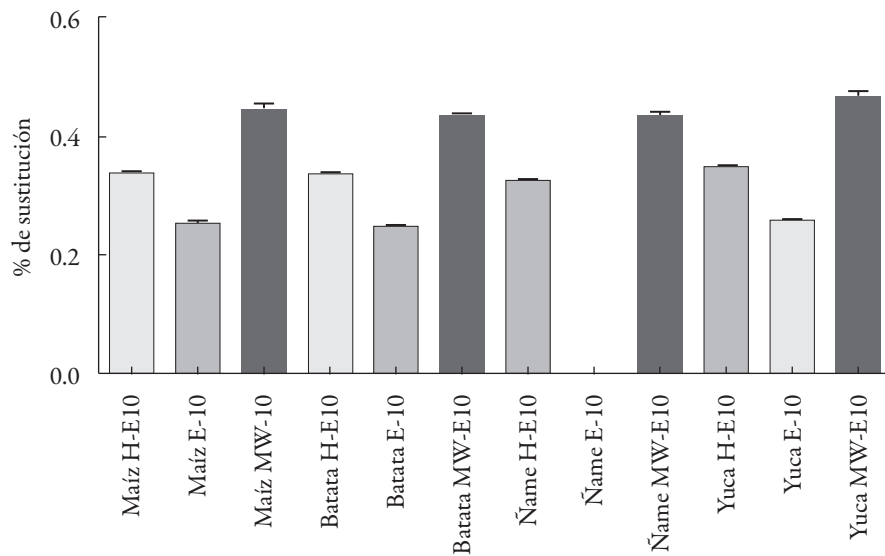


Figura 1. Representación gráfica de los porcentajes de sustitución de los almidones modificados.

Comúnmente, la introducción del grupo hidrofóbico alifático del DDSA con un alto grado de sustitución dentro de la estructura del almidón modifica sus propiedades superficiales, lo cual se observa en la figura 2, reportada por Torrenegra *et al.* [5].

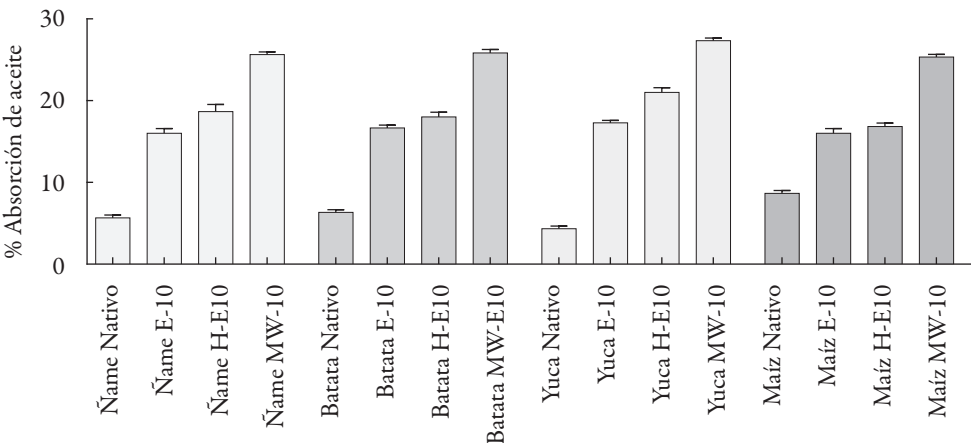


Figura 2. Representación gráfica de los porcentajes de captación de aceite de todos los almidones [5].

Según la figura 2, la capacidad de captación de aceite de los almidones nativos aumentó de manera significativa por el proceso de esterificación, y se observó que los almidones

modificados por el método de microondas presentaron mejores resultados, lo cual está directamente relacionado con el alto porcentaje de sustitución. Por otro lado, la capacidad emulsificante de los almidones modificados con DDSA fue más o menos igual para los cuatro almidones: maíz, batata, ñame y yuca; no obstante, este último presentó el mayor porcentaje frente a las cuatro sustancias oleosas evaluadas. Igualmente, se destaca que los almidones nativos tuvieron una capacidad de emulsificación nula (figuras 3, 4 y 5).

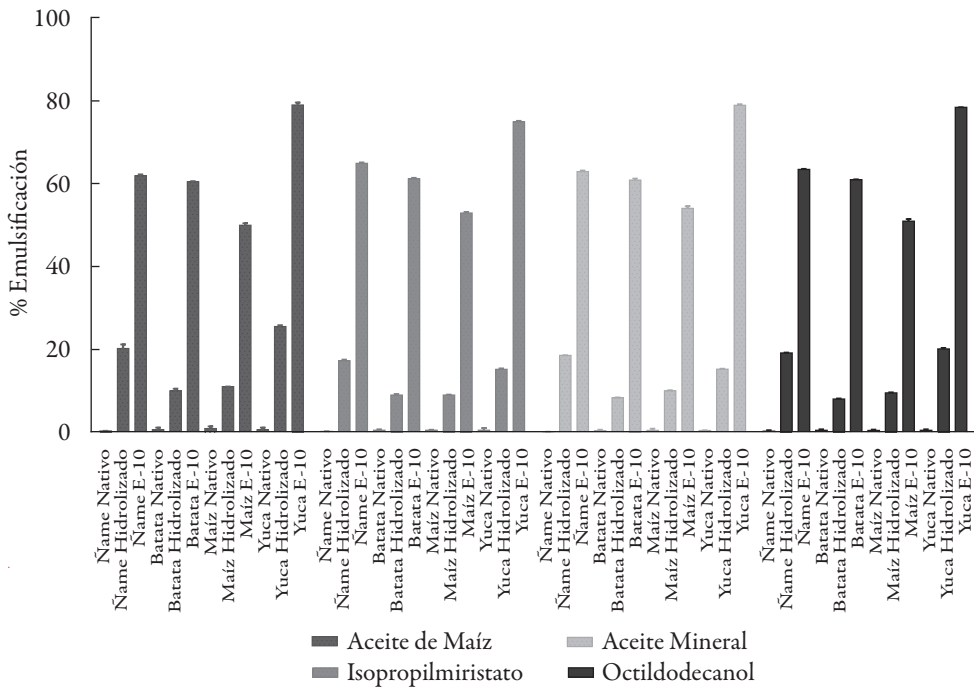


Figura 3. Representación gráfica de los porcentajes de emulsificación de todos los almidones obtenidos mediante hidrólisis y esterificación.

Para la estimación de la huella de carbono de los procesos de modificación de almidones, se tuvo en cuenta el alcance 2 asociado con el consumo de electricidad de los equipos utilizados en cada una de las operaciones y sus características como potencia y tiempo de funcionamiento (figura 6). Por tanto, se observó que el método con menor impacto ambiental en cuanto a toneladas de CO₂ emitidas, fue el método 3 de esterificación realizada en horno microonda, seguido del método 1 y método 2 (tabla 1). Se infiere que el tiempo de duración (25 horas) y la utilización del horno microondas fueron determinantes en este resultado, convirtiéndolo en una práctica amigable al medioambiente para el proceso de modificación de almidones nativos.

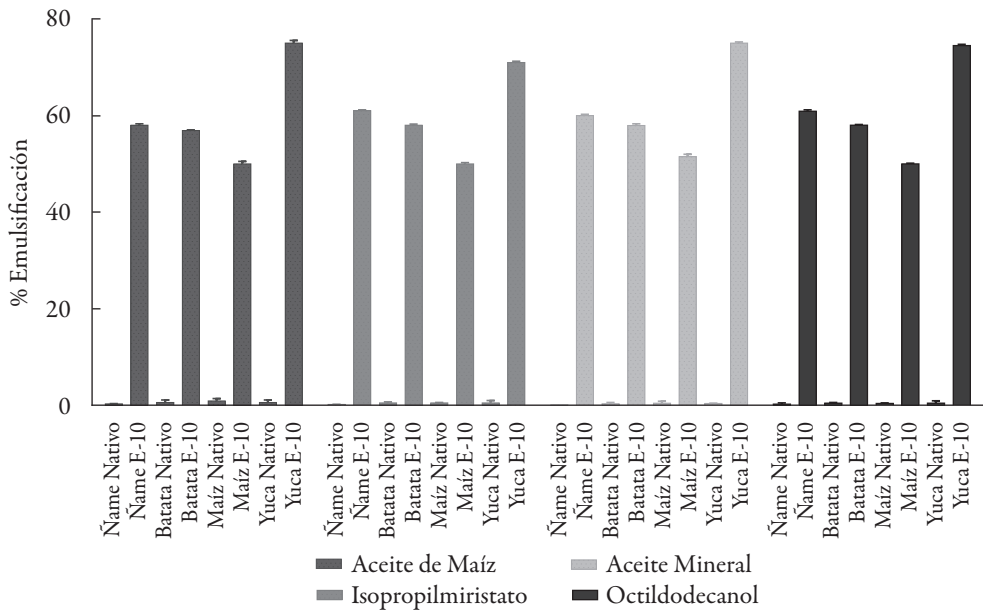


Figura 4. Representación gráfica de los porcentajes de emulsificación de todos los almidones obtenidos mediante esterificación directa.

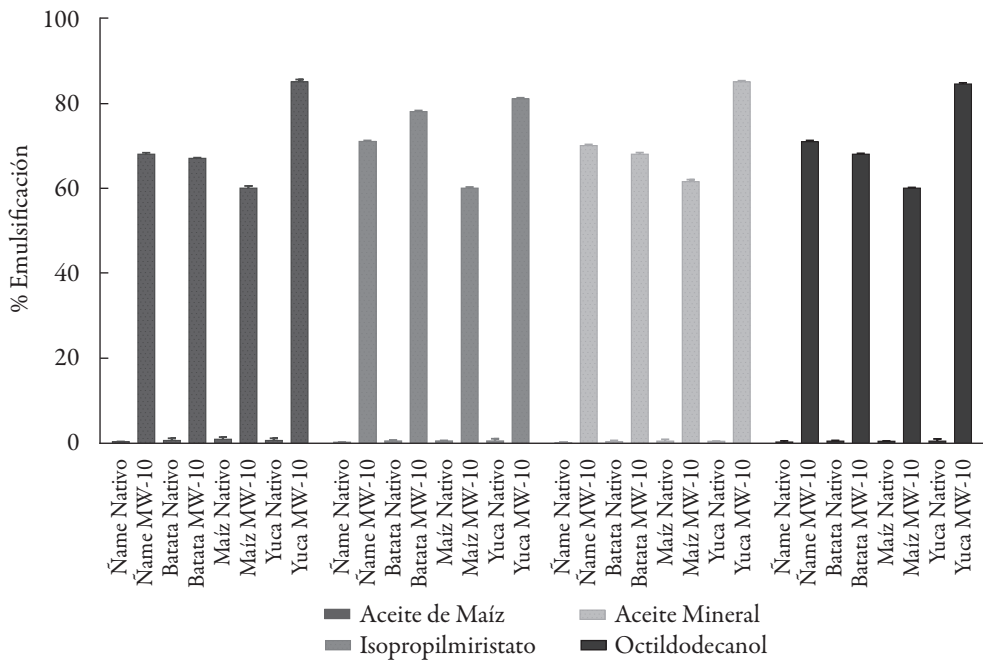


Figura 5. Representación gráfica de los porcentajes de emulsificación de todos los almidones obtenidos mediante esterificación por microondas.

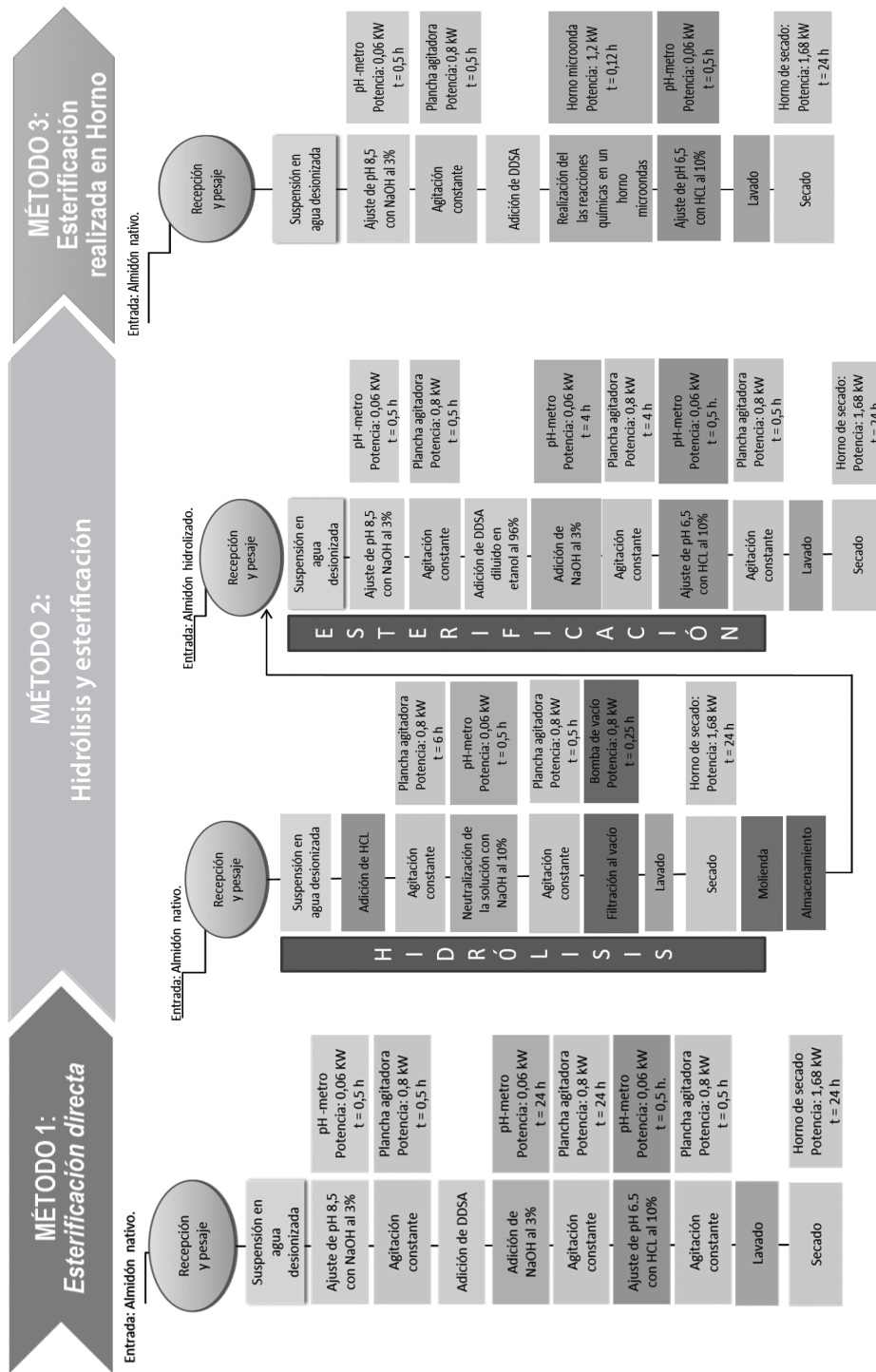


Figura 6. Diagrama de flujo de los procesos de modificación de almidones y los respectivos equipos asociados a las operaciones.

Tabla 1. Emisiones de CO₂ de los procesos de modificación química de almidones nativos.

Método	Alcance	Fuente – actividad	Dato de actividad (MWh)	Factor de emisión (Ton CO ₂ / MWh)	Emisiones (Ton CO ₂ equivalente)
1	Alcance 2	Consumo de electricidad	0,06182	0,197	0,01217854
2	Alcance 2		0,09037		0,01780289
3	Alcance 2		0,04092		0,00806124

DISCUSIÓN

Los trabajos publicados sobre la modificación de almidones con otros anhídridos (anhídrido octenil succínico–OSA), han demostrado que un aumento de la temperatura en la reacción produce un aumento en el grado de sustitución del producto, pero siempre se encuentra limitado por la poca estabilidad del almidón cuando es expuesto al calor. Asimismo, el campo magnético producido por la microonda interactúa directamente sobre las moléculas, permitiendo únicamente la rotación de estas, obteniéndose así un incremento de la cinética de reacción y grados de sustitución mayores; antes de que ocurra la degradación del almidón por efecto de un sobrecalentamiento [15]. De esto se desprende una ventaja del uso de radiación de microondas para llevar a cabo las reacciones. En cuanto a la comparación de los tres métodos de modificación, es evidente que el proceso en microondas representa una mayor eficiencia, no solo por un GS superior correspondiente a una mayor eficiencia química, sino también en el tiempo de reacción, donde se sustituye un proceso realizado en 24 horas de esterificación directa, 10 horas de hidrólisis y posterior esterificación a un calentamiento en microondas de tan solo 7 minutos.

Los agentes emulsificantes son estabilizadores coloidales, que contienen grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. La parte hidrofílica puede ser iónica (por ejemplo, laurilsulfato sódico —SLS— teniendo un mecanismo estabilizador netamente electrostático), no iónico (nonil fenol etoxilado o el nonanol etoxilado), o ambos (por ejemplo, algunos estabilizadores proteicos). Se destaca que el mecanismo por el cual realizan la estabilización puede ser electrostático o estérico. Los almidones modificados con DDSA pueden funcionar como estabilizadores electrostáticos, aunque debido al tamaño de las moléculas en relación con el número de grupos cargados, su función es principalmente estérica [9]. Cabe resaltar que la esterificación de almidones ha sido utilizada durante los últimos años como un método para la obtención de surfactantes que sirvan para estabilizar sistemas bifásicos agua/aceite. Cuando se incorpora el grupo hidrofóbico de cadena alifática dentro de la molécula hidrofílica del almidón, le permite establecer una fuerte interacción en la interfase agua/aceite dándole a la emulsión resistencia a

la reaglomeración [9]. Asimismo, se ha mostrado que la incorporación de cadenas de doce carbonos en el almidón mejora las características termoplásticas y la estabilidad térmica de los ésteres de almidón [5].

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, no hubo diferencias significativas entre el porcentaje de sustitución de todos los almidones evaluados. Lo que demuestra que todos los almidones pueden ser sustituidos. Por otro lado, la capacidad emulsificante tampoco tuvo diferencias significativas entre los almidones estudiados.

Con base en los resultados presentados, se concluye que los almidones esterificados (lipofilizados) de ñame, batata, maíz y yuca, nativos de América, y relativamente poco estudiados para usos diferentes a los comestibles, tienen una alta potencialidad de emplearse como agente emulsificante en el diseño de preparaciones cosméticas. Asimismo, el “método en microondas” presentó algunas ventajas en comparación con los demás métodos, de las cuales destacamos: aumento de la eficiencia de esterificación, disminución del tiempo de reacción de esterificación y menor impacto ambiental. Con relación a la última ventaja, cabe resaltar que los datos obtenidos sobre la huella de carbono en cada uno de los procesos para la modificación de los almidones nativos, marcan un precedente para otros estudios, debido a que no se conocen datos numéricos o indicadores con los cuales se puedan comparar y que señalen en qué punto es negativo, regular o bueno. Por lo que la importancia de la medición de este parámetro radica en que ya no será algo que se deba hacer por obligación, sino más bien una ventaja competitiva que gira en torno al desarrollo sostenible de los procesos químicos e industriales, donde cada día se es más consciente de la problemática ambiental.

CONCLUSIONES

Los almidones esterificados pueden ser utilizados como agentes emulsificantes en preparaciones cosméticas, y el método en microondas es el que presentó mayores ventajas, dentro de las cuales está el menor impacto ambiental.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias y a la Gobernación de Sucre en el marco de la Convocatoria 697 para la formación de capital humano de alto nivel para el departamento de Sucre, Maestría Nacional 2014. De igual forma, al Sistema de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación (Sennova) del Centro de Comercio y Servicios Regional Bolívar - SENA, por facilitar los recursos; asimismo, a la Universidad de Cartagena y Universidad de Sucre por brindar espacio y tiempo de sus investigadores.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaramos que no tenemos conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. M. Aguilera-Díaz, “La yuca en el Caribe colombiano: de cultivo ancestral a agro-industrial”, Documentos de trabajo sobre economía regional No. 158, Banco de la República, Bogotá, 2012.
2. J. Figueroa, J. Salcedo, M. Rodríguez, Almidones acetilados de yuca y ñame para uso alimentario, *Agronom. Colomb.*, **34**(Supl. 1), S785-S788 (2016).
3. Y.C. Reina, “El cultivo del ñame en el Caribe colombiano”, Documentos de trabajo sobre economía regional No. 168, Banco de la República, Bogotá, 2012.
4. M.E. Torrenegra, G. León-Méndez, G.E. Matiz-Melo, J.D. Sastoque-Gómez, Lipofilización del almidón de *Dioscorea rotundata* P. y su posible uso como agente emulsificante, *Rev. Cubana Farm.*, **49**(4), 605-617 (2015).
5. M.E. Torrenegra, M.R. Osorio-Fortich, G. León-Méndez, B. González-Petro, Esterificación de almidones propios de la región Caribe colombiana, *Rev. Cubana Farm.*, **50**(4) (2016). URL: <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/59/63>.
6. G.E. Matiz, G. León, K. Fuentes, Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*) modificado, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**(2), 189-207 (2015).
7. L.A. Bello-Pérez, S.M. Contreras-Ramos, R. Romero-Manilla, J. Solorza-Feria, A. Jiménez-Aparicio, Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano *Musa paradisiaca* L. (var. macho), *Agrociencia*, **36**(2), 169-180 (2002).
8. O.I. Peñaranda, J.E. Perilla, N.A. Algecira, Revisión de la modificación química del almidón con ácidos orgánicos, *Rev. Ing. Invest.*, **28**(3), 47-52 (2008).
9. M.C. Sweedman, M.J. Tizzotti, C. Schäfer, R.G. Gilbert, Structure and physico-chemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review, *Carbohydr. Polym.*, **92**, 905-920 (2013).

10. M. Hernández-Medina, J.G. Torruco-Uco, L. Chel-Guerrero, D. Betancur-Ancona, Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, **28**(3), 718-726 (2008).
11. M. Stasiak, M. Molenda, J. Horabik, P. Mueller, I. Opalińsk, Mechanical properties of potato starch modified by moisture content and addition of lubricant, *Int. Agrophys.*, **28**, 501-509 (2014).
12. E.R. Zavareze, V.Z. Pinto, B. Klein, S.L.M. Halal, M.C. Elias, C. Prentice-Hernández, A.R.G. Dias, Development of oxidized and heat-moisture treated potato starch film, *Food Chem.*, **132**, 344-350 (2012).
13. CEPAL, “Informe ejecutivo de los estudios de medición de la Huella de Carbono a la estevia y uchuva deshidratadas – Colombia”, 2014. URL: http://www.colombiatrade.com.co/sites/default/files/Informe_ejecutivo_Colombia_25042_14_FINAL_sin_anexos.pdf.
14. H. Chi, K. Xu, D. Xue, C. Song, W. Zhang, P. Wang, Synthesis of dodecenyl succinic anhydride (DDSA) corn starch, *Food Res. Int.*, **40**, 232-238 (2007).
15. I.E. Rivero, “Desarrollo de mezclas de polietileno lineal de baja densidad y almidón de yuca”, trabajo de grado, Universidad Simón Bolívar, Sartenejas, 2007. URL: <http://159.90.80.55/tesis/000141529.pdf>.
16. IHOBE, “Análisis de ciclo de vida y huella de carbono. Dos maneras de medir el impacto ambiental de un producto”, 2009. URL: <http://www.ihobe.eus/Paginas/Ficha.aspx?IdMenu=c5e31d77-0bba-401c-9b9a-f10a42dac57e&Idioma=es-ES>.
17. US Food and Drug Administration (FDA), Código de regulación federal, título 21, vol. 3, College Park, MD, 2006.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO:

M.S. Caro-Soto, M.E. Torrenegra-Alarcón, M.R. Osorio-Fortich, G. León-Méndez, N.P. Pajaro, Evaluación del impacto ambiental del proceso de modificación química de almidones nativos como potenciales excipientes en la industria cosmética, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(2), 217-231 (2018).

Agentes dopaminérgicos centrales análogos *N*-aralquil metoxilados del 2-aminoindano

Geraldine Suárez Bozo¹, María Sanguino Díaz¹, Gerardo Lucena¹, Miriam Ocampo Hernández¹, Lucía Rodríguez Villasmil¹, Katherin Balza Jiménez¹, Mariagracia Vera Sosa¹, Ligia Ángel Migliore¹, Biagina Migliore de Ángel¹, Jaime Charris Charris², Anita Israel³, Simón López D' Sola⁴, Rodolfo Izquierdo¹, José Caldera Luzardo¹, José Ortega Fernández¹, María Ramírez Morán¹, Jorge Ángel Guio^{1*}

¹ Laboratorio de Síntesis Orgánica, Diseño y Evaluación Farmacológica de nuevos productos, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

*Correo electrónico: jangel63@yahoo.com

² Laboratorio de Síntesis Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

³ Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

⁴ Department of Chemistry, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.

Recibido para evaluación: 15 de febrero de 2018

Aceptado para publicación: 2 de abril de 2018

RESUMEN

La neurotransmisión dopaminérgica interviene en los mecanismos que involucran los procesos motores, cognoscitivos, conductuales y neurocrinos y su mal funcionamiento la involucra en los trastornos neurodegenerativos que afectan al sistema nervioso central (SNC), tales como en la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, entre otras. Con el propósito de encontrar una solución terapéutica a estas patologías, en publicaciones anteriores hemos reportado la síntesis, la evaluación farmacológica y el estudio teórico computacional de los compuestos análogos mono y dihidroxilados (sobre el anillo indano) del *N*-aralquil-2-aminoindano **4-8**, análogos 4,7-dimetoxi-2-aminoindano-*N*-aralquil, bajo sus formas metoxiladas sobre el anillo bencénico del fragmento aralquil **9** y el derivado fenólico **10**, así como también los análogos diclorados del *N*-aralquil-2-aminoindano **11** con actividades dopaminérgicas centrales. En el presente trabajo se sintetizaron los clorhidratos del 2-aminoindano-*N*-[2-(mono o dimetoxi)-fenil]-1-metil-etil] **12-15** y su evaluación farmacológica mostraron respuestas agonísticas como potenciales agentes antihuntington y antipárkinson.

Palabras clave: enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, agonistas dopaminérgicos, *N*-aralkil, aminoindano.

SUMMARY

Central dopaminergic agents analogues of *N*-aralkyl methoxylated of 2-aminoindane

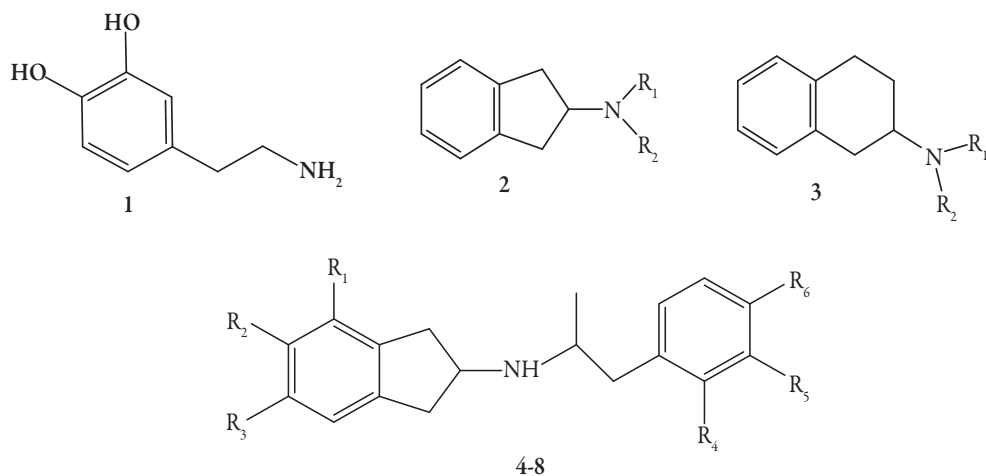
Dopaminergic neurotransmission is implicated in mechanisms that involve motor, cognitive, conductual and neurocrine process, and its malfunction involves it in neurodegenerative disorders affecting central nervous system (CNS), like Parkinson's disease and Huntington's disease, among others. On the purpose of finding some therapeutic for these pathologies, in previous researches we have reported synthesis, pharmacological evaluation and theoretical computational study of compounds analogues mono or di hydroxylated (on indane ring) of *N*-aralkyl-2-aminoindane **4-8**, analogues 4,7-dimethoxy-2-aminoindane-*N*-aralkyl, under its methoxylated forms on benzene ring of aralkyl fragment **9** and phenolic derivative **10**, also dichloride analogs of *N*-aralkyl-2-aminoindane **11** with central dopaminergic activities. In this work were synthesized hydrochlorides of 2-aminoindane-*N*-[(mono or di methoxy)-phenyl-1-methyl-ethyl] (**12-15**) and its pharmacologic evaluation showed agonistic responses as potential agents anti Huntington and/or anti Parkinson.

Key words: Huntington's disease, Parkinson's disease, dopaminergic agonists, *N*-aralkyl, aminoindane.

INTRODUCCIÓN

Es bien conocido que la dopamina (DA) es un neurotransmisor esencial del funcionamiento del sistema nervioso central (SNC), e interviene en los mecanismos que involucran los procesos motores, cognoscitivos, conductuales y neurocrinos [1]. Las neuronas dopaminérgicas ubicadas principalmente en la sustancia negra, el cuerpo estriado y en el sistema límbico son relacionadas directa o indirectamente con múltiples trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Huntington (EH) [2-4]. En la EP ocurre un déficit de DA ocasionada por la degeneración progresiva de las vías dopaminérgicas nigroestriadas [5-7], mientras que en la EH se caracteriza por un desequilibrio en el control del movimiento en los ganglios basales, debido a la degeneración de la mayor parte de los cuerpos neuronales secretores de GABA en el núcleo caudado, putamen y de las neuronas secretoras de acetilcolina

de diferentes regiones del encéfalo [8, 9]. Con el propósito de encontrar una solución terapéutica a estas patologías, se han diseñado y sintetizado numerosos compuestos, análogos del 2-aminoindano **2** y 2-aminotetralina **3** a los cuales se les ha incorporado aproximaciones farmacofóricas necesarias para interactuar en los blancos de acción dentro del sistema dopaminérgico central (figura 1).

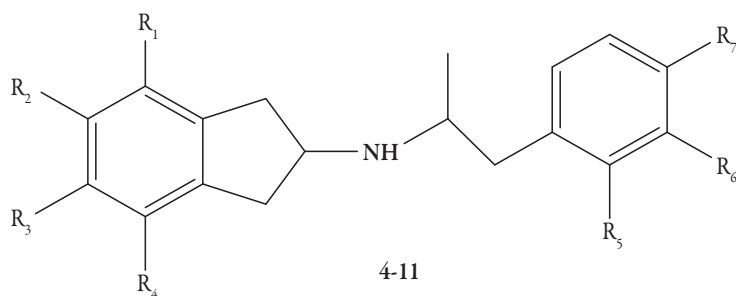


Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
4	H	OH	OH	H	H	H
5	OH	H	H	H	H	H
6	H	OH	H	H	H	H
7	H	H	H	H	H	OH
8	OH	OH	H	H	OH	OH

Figura 1. Estructura de los compuestos 1-3.

En publicaciones anteriores hemos reportado la síntesis, la evaluación farmacológica y el estudio teórico computacional de los análogos mono y dihidroxilados (sobre el anillo indano) del *N*-aralquil-2-aminoindano 4-8. Estas sustituciones se realizaron sobre ambos anillos bencénicos y, en especial, se observó que la incorporación al menos de un grupo OH sobre el fragmento aralquil, modificaba la actividad dopaminérgica central desde las respuestas agonísticas hacia las antagonistas, es decir, se obtenían compuestos que ejercían su actividad como antagonistas [10-14]. Asimismo, se encontraron actividades similares en los análogos 4,7-dimetoxi-2-aminoindano-*N*-aralquil, bajo sus formas metoxiladas sobre el anillo bencénico del fragmento aralquil **9** y el derivado fenólico **10**, respectivamente [15]. Por otro lado, cuando se incorporan los átomos de

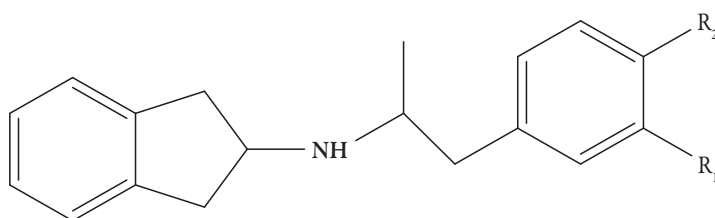
cloro sobre el anillo bencénico del *N*-aralquil, en los derivados del 2-aminoindano 11 se consiguieron actividades agonísticas (figura 2) [16].



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
4	H	OH	OH	H	H	H	H
5	OH	H	H	H	H	H	H
6	H	OH	H	H	H	H	H
7	H	H	H	H	H	H	OH
8	OH	OH	H	H	H	OH	OH
9	OMe	H	H	OMe	H	OMe	OMe
10	OH	H	H	OH	H	OH	OH
11	H	H	H	H	Cl/H	H/Cl	Cl

Figura 2. Estructura de los compuestos 4-11.

En el presente trabajo se sintetizaron los clorhidratos del 2-aminoindano-*N*-[2-(mono o dimetoxi)-fenil]-1-metil-etil] 12-15 y su evaluación farmacológica mostró una respuesta agonística a través de mecanismos dopaminérgicos centrales. Esta investigación es un importante aporte para el desarrollo de nuevos fármacos, capaces de restablecer la homeostasis de la transmisión dopaminérgica en las enfermedades de Parkinson o Huntington (figura 3).



12-15

Compuesto	R ₁	R ₂
12	H	H
13	OMe	OMe
14	H	OMe
15	OMe	H

Figura 3. Estructura de los compuestos 12-15.

METODOLOGÍA

La síntesis de los productos finales 12-15 (figura 4), se realizó a través de la reacción de aminación reductiva, entre los intermediarios claves 16 y 17a-d, previamente sintetizados [14-18]. La existencia de los intermediarios claves y los productos finales, se confirmaron por medio de sus datos espectroscópicos de RMN de ¹H, ¹³C, HETCOR, COSY y DEPT.

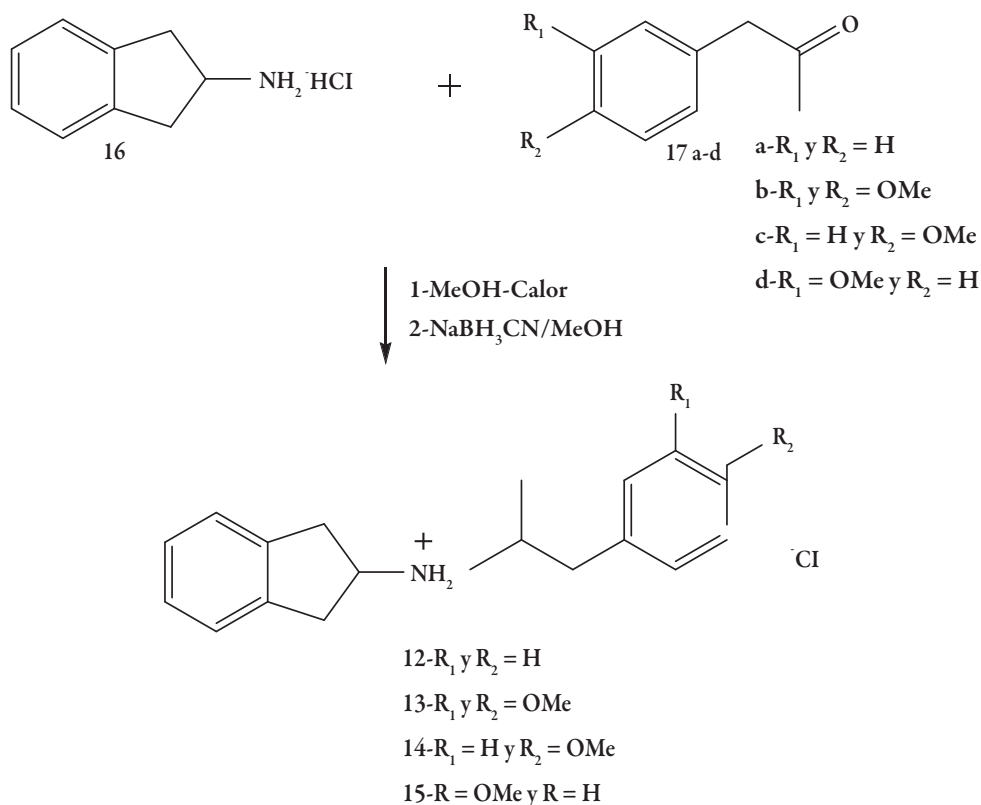


Figura 4. Ruta sintética de los compuestos 12-15.

Sección química

Todos los reactivos y solventes utilizados en la síntesis fueron de grado analítico; en los casos necesarios, los solventes se sometieron a procesos previos de secado mediante métodos estándar. Se emplearon los siguientes solventes y reactivos: metanol R. A. Merck (Alemania), cianoborohidruro de sodio SIGMA-ALDRICH (E. U.), ácido clorhídrico SIGMA-ALDRICH (E. U.), éter etílico SIGMA-ALDRICH (E. U.) y sulfato de sodio anhidro SIGMA-ALDRICH (E. U.). Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C se realizaron en un espectrómetro Jeol de 270 MHz (E. U.) ubicado en la Facultad de Farmacia-UCV. Los desplazamientos químicos son reportados en partes por millón (ppm). Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Stuart Scientific SIGMA-ALDRICH (E. U.). El análisis elemental se realizó en un equipo Perkin Elmer 2400 CHN elemental analyzer (E. U.), los resultados están en el rango de $\pm 0,4\%$ de su valor teórico.

Síntesis de los análogos clorhidratos del 2-aminoindano-N-[2-(mono o dimetoxi)-fenil]-1-metil-etil] 12-15

Se sometió a reflujo una mezcla del compuesto **16** (0,41 mmol) disuelto 20 mL de metanol con el compuesto **17 a-d** (0,82 mmol), por 6 horas. Posteriormente, se añadió cianoborohidruro de sodio (3,5 mmol) y se dejó a temperatura ambiente en agitación por 72 horas. Al cabo de este período se trató la mezcla con 2 mL de HCl (concentrado) y las sustancias volátiles se eliminaron bajo presión reducida. La mezcla resultante se trató con agua destilada (20 mL) y se extrajo con éter etílico. La fase acuosa fue llevada a pH 10 con granallas de hidróxido de sodio y se extrajo nuevamente con éter etílico. Los extractos orgánicos se lavaron con agua, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y el solvente se evaporó a presión reducida. El producto final, de aspecto aceitoso, se trató con éter etílico-HCl para obtener un sólido que fue recristalizado en isopropanol-éter.

Clorhidrato de N-[2-(fenil)-1-metil-etil]-2-aminoindano 12

Sólido blanco, pf.: 182-184 °C (pf.: 195-198 °C) [18], 0,070 g (58,54%). RMN ^1H (DMSO- d_6 , 270 MHz) δ (ppm): 1,29 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, CH_3); 2,75 (1H, dd, $J = 10,1$ Hz y 13,1 Hz, CH_2 Ar); 3,18 (2H, dd, $J = 7,2$ Hz, CH_2 (C_1 o C_3 pseudoecuatoriales)); 3,32 (1H, dd, $J = 4,4$ Hz y 11,8 Hz, CH_2 -Ar); 3,41 (2H, ddd, $J = 4,2$ Hz y 7,9 Hz, CH_2 (C_1 o C_3 pseudoaxiales)); 3,63 (1H, m, $J = 5,9$ Hz, CH (aralquil)); 4,29 (1H, m, $J = 7,9$ Hz y $J = 7,4$ Hz, CH C_2 -indano); 7,28 (9H, m, ArH). RMN ^{13}C (D_2O , 67,5 MHz) δ (ppm): 15,0 (CH_3 -aralquil); 35,8 (CH_2 (C_1 o C_3 -indano)); 39,1 (CH_2 Ar-aralquil); 48,6 (CH -aralquil); 54,4 (CH (C_2 -indano)); 124,4; 127,1; 127,2; 128,6; 129,1; 135,9; 138,8 carbonos aromáticos. RMN-COSY: A 1,29 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, CH_3) se correlaciona con

la señal a 3,63 (1H, m, CH (aralquil)). Anal. calcd. C₁₈H₂₂ClN (287,14): C, 75,11; H, 7,70; N, 4,87; encontrado: C, 75,17; H, 7,75; N, 5,02%.

Clorhidrato de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-1-metil-etil]-2-aminoindano 13

Sólido blanco, pf.: 176-178 °C, 0,110g (78,05%). RMN ¹H (MeOH-d₃, 270 MHz) δ (ppm): 1,29 (3H, d, J = 6,4 Hz, CH₃); 3,04 (1H, dd, J = 4,4 Hz y 16,5 Hz, CH₂ Ar); 3,21 (2H, dd, J = 6,7 Hz y 6,9 Hz, CH₂ (C₁ o C₃ pseudoaxiales)); 3,36 (1H, dd, J = 4,4 Hz y 16,5 Hz, CH₂-Ar); 3,41 (2H, ddd, J = 4,2 Hz y 7,4 Hz, CH₂ (C₁ o C₃ pseudoecuatoriales)); 3,84 (3H, s, OCH₃); 3,87 (3H, s, OCH₃); 4,02 (1H, m, CH, (aralquil)), 4,25 (1H, m, CH, C₂-indano); 7,01 (1H, d, J = 8,2 Hz y J = 1,9 Hz, ArH₅-aralquil); 7,10 (1H, dd, J = 1,8 Hz y 8,2 Hz, ArH₆-aralquil); 7,26 (5H, m, ArH₄-indano y H₂-aralquil). RMN ¹³C (MeOH-d₃, 67,5 MHz) δ (ppm): 15,0 (CH₃-aralquil); 35,7 (CH₂ (C₁ o C₃-indano); 38,8 (CH₂Ar-aralquil); 49,8 (CH (C₂-indano); 51,0 (CH-aralquil); 55,4 y 55,4 (OCH₃); 111; 113; 123; 124; 124,6; 127,2 carbonos aromáticos. RMN-HETCOR δ (ppm): la señal a 1,29 (3H, d, J = 6,4 Hz, CH₃) se correlaciona con 15,0 (CH₃-aralquil); las señales a 3,04 (1H, dd, J = 16,5 Hz y J = 4,4 Hz, CH₂ Ar) y 3,36 (1H, dd, J = 16,5 Hz y 4,5 Hz, CH₂-Ar) se correlacionan con 38,78 (CH₂Ar-aralquil); las señales a 3,21 (2H, dd, J = 6,9 Hz y 6,7 Hz, CH₂ (C₁ o C₃ pseudoaxiales)) y 3,41 (2H, ddd, J = 4,2 Hz y 7,4 Hz, CH₂ (C₁ o C₃ pseudoecuatoriales)) se correlacionan con la señal a 35,7 (CH₂ (C₁ o C₃-indano); las dos señales a 3,84 (3H, s, OCH₃) y 3,87 (3H, s, OCH₃) se correlacionan con las señales a 55,4 y 55,4 (OCH₃); la señal a 4,02 (1H, m, CH-aralquil)) se correlaciona con la señal a 51,0 (CH-aralquil); el multiplete a 4,25 (1H, m, CH C₂-indano) se correlaciona con la señal a 49,8 (CH (C₂-indano); la señal a 7,01 (1H, d, J = 8,2 Hz y J = 1,9 Hz, ArH₅-aralquil) se correlaciona con la señal a 127,2 (ArCH (C₅-aralquil); a 7,10 (1H, dd, J = 8,2 Hz, ArH₆-aralquil) se correlaciona con la señal a 111 (ArCH (C₆-aralquil) y, finalmente, la señal a 7,26 (5H, m, ArH 4H-indano y H₂-aralquil) se correlaciona con las señales a 113, 123, 124, 124,6 (Ar CH (C₂-aralquil) y 127,2. Anal. calcd. C₂₀H₂₆ClNO₂ (347,17): C, 69,05; H, 7,53; N, 4,03; encontrado: C, 69,03; H, 7,60; N, 4,19%.

Clorhidrato de N-[2-(4-metoxi-fenil)-1-metil-etil]-2-aminoindano 14

Sólido amarillo pálido blanco, pf.: 185-187 °C, 0,110 g (85,37%). RMN ¹H (DMSO-d₆, 270 MHz) d (ppm): 1,16 (3H, d, J = 6,4 Hz, CH₃); 2,61 (1H, pseudot, CH₂ Ar); 3,27 (2H, dd, CH₂ C₁ o C₃ pseudoecuatoriales); 3,31 (1H, pseudot, CH₂-Ar); 3,33 (2H, dd, CH₂ (C₁ o C₃ pseudoaxiales)); 3,35 (1H, m, CH, (aralquil)); 3,73 (3H, s, OCH₃); 4,23 (1H, m, J = 7,9 Hz, CH C₂-indano); 6,90 (4H, d, ArH (aralquil)); 7,22 (5H, m, ArH (indano)). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 67,5 MHz) d (ppm): 15,9 (CH₃-aralquil); 36,2 (CH₂ (C₁ o C₃ indano)); 38,2 (CH₂-Ar-aralquil); 54,2 (CH-aralquil); 55,0 (OCH₃); 55,6 (CH (C₂-indano)); 114,5; 125,0; 127,5; 129,1; 130,9; 140,1; 158,7 carbonos

aromáticos. RMN-DEPT (DMSO- d_6) δ (ppm): 15,9 ($\underline{\text{CH}}_3$ -aralquil); 36,2 ($\underline{\text{CH}}_2$ (C_1 o C_3 -indano)); 38,2 ($\underline{\text{CH}}_2$ -Ar-aralquil); 54,2 ($\underline{\text{CH}}$ -aralquil); 55,0 ($\text{O}\underline{\text{CH}}_3$); 55,6 ($\underline{\text{CH}}$ (C_2 -indano)); 114,5; 125,0; 127,5; 129,1; 130,9; 140,1; 158,6 carbonos aromáticos (CH). RMN-COSY (DMSO- d_6) δ (ppm): A 1,16 (3H , d, $J = 6,4$ Hz, $\underline{\text{CH}}_3$) se correlaciona con las señales a 3,35 ppm (1H , m, $\underline{\text{CH}}_2$ -Ar) y 3,31 (1H , *pseudot*, $\underline{\text{CH}}_2$ -Ar). Por último, la señal a 4,23 (1H , m, $J = 7,90$ Hz, $\underline{\text{CH}}$ C_2 -indano) se correlaciona con las señales a 3,27 (2H , dd, $\underline{\text{CH}}_2$ C_1 o C_3 pseudoecuatoriales) y 3,33 (2H , dd, $\underline{\text{CH}}_2$ (C_1 o C_3 pseudoaxiales). Anal. calcd. $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClNO}$ (317,15): C, 71,80; H, 7,61; N, 4,41; encontrado: C, 71,83; H, 7,62; N, 4,67%.

Clorhidrato de N-[2-(3-metoxi-fenil)-1-metil-etil]-2-aminoindano 15

Sólido blanco, pf.: 181-182 °C, 0,117 g (90,24%). RMN ^1H (MeOH- d_4 , 270 MHz) δ (ppm): 1,29 (3H , d, $J = 6,4$ Hz, $\underline{\text{CH}}_3$); 2,75 (1H , dd, $J = 13,1$ Hz y 4,4 Hz, $\underline{\text{CH}}_2$ Ar); 3,22 (2H , dd, $J = 7,4$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2$ C_1 o C_3 pseudoaxiales); 3,32 (1H , dd, $J = 13,1$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2$ -Ar); 3,44 (2H , dd, $J = 7,4$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2$ C_1 o C_3 pseudoecuatoriales); 3,64 (1H , m, $\underline{\text{CH}}$ (aralquil)); 3,80 (3H , s, $\text{O}\underline{\text{CH}}_3$); 4,27 (1H , p, $\underline{\text{CH}}$ C_2 -indano); 6,85 (1H , dd, $J = 8,1$ Hz y 2,4 Hz, $\text{Ar}\underline{\text{H}}_6$ '-aralquil); 6,87 (1H , dd, $J = 6,1$ Hz y 2,5 Hz, $\text{Ar}\underline{\text{H}}_4$ '-aralquil); 6,88 (1H , dd, $J = 1,1$ Hz y 3,0 Hz, $\text{Ar}\underline{\text{H}}_2$ '-aralquil); 7,22 (4H , m, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$ -indano); 7,27 (1H , *pseudot*, $J = 7,3$ Hz, $\text{Ar}\underline{\text{H}}_5$ '-aralquil). RMN ^{13}C (MeOH- d_4 , 67,5 MHz) δ (ppm): 15,0 ($\underline{\text{CH}}_3$ -aralquil); 35,7 ($\underline{\text{CH}}_2$ (C_1 o C_3 -indano)); 39,1 ($\underline{\text{CH}}_2$ Ar, aralquil); 47,7 ($\text{O}\underline{\text{CH}}_3$); 55,0 ($\underline{\text{CH}}$ -aralquil); 56,0 ($\underline{\text{CH}}$ (C_2 -indano)); 112,3; 114,9; 121,3; 129,6; 137,5 (cuaternario) y 160,2 (cuaternario) carbonos aromáticos aralquílicos; 124,4; 127,2; 138,8 (cuaternario) carbonos aromáticos del indano. RMN-HETCOR δ (ppm): a 1,29 (3H , d, $J = 6,4$ Hz, $\underline{\text{CH}}_3$) se correlaciona con la señal a 15,0 ($\underline{\text{CH}}_3$ -aralquil); la señal a 2,75 y 3,32 (1H , dd, $\underline{\text{CH}}_2$ Ar) se correlacionan con la señal a 39,12 ($\underline{\text{CH}}_2$ Ar-aralquil); la señal a 3,22 y 3,44 (2H , dd, $\underline{\text{CH}}_2$ (C_1 o C_3 -indano)) se correlacionan con la señal a 35,95 ($\underline{\text{CH}}_2$ (C_1 o C_3 -indano)); la señal a 3,80 (3H , s, $\text{O}\underline{\text{CH}}_3$) se correlaciona con la señal a 47,7 ($\text{O}\underline{\text{CH}}_3$); la señal a 3,64 (1H , m, $\underline{\text{CH}}$ (aralquil)) se correlaciona con la señal a 55,0 ($\underline{\text{CH}}$ -aralquil); la señal a 4,27 (1H , p, $\underline{\text{CH}}$ (C_2 -indano)) se correlaciona con la señal a 56,0 ($\underline{\text{CH}}$ (C_2 -indano)); la señal a 6,85 (1H , dd, $J = 8,1$ Hz y 2,5 Hz, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$ (H_6 '-aralquil)) se correlaciona con la señal a 121,3 ($\text{Ar}\underline{\text{CH}}$ (C_6 '-aralquil)); la señal 6,87 (1H , dd, $J = 6,1$ Hz y 2,5 Hz, $\text{Ar}\underline{\text{H}}_4$ '-aralquil) se correlaciona con la señal a 114,9 ($\text{Ar}\underline{\text{CH}}$ (C_4 '-aralquil)); la señal a 6,88 (1H , dd, $J = 1,1$ Hz y 3,1 Hz, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$ (H_2 '-aralquil)) se correlaciona con la señal a 112,37 ($\text{Ar}\underline{\text{CH}}$ (C_2 '-aralquil)); la señal a 7,22 (4H , m, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$ (H-indano)) se correlaciona con las señales a 124,4 y 127,2 ($\text{Ar}\underline{\text{CH}}$ (C_4 y C_5 -indano)); y, finalmente, la señal a 7,27 (1H , *pseudot*, $J = 7,4$ Hz, $\text{Ar}\underline{\text{H}}_5$ '-aralquil) se correlaciona con la señal a 129,6 ($\text{Ar}\underline{\text{CH}}$ (C_5 '-aralquil)). Anal. calcd. $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClNO}$ (317,15): C, 71,80; H, 7,61; N, 4,41; encontrado: C, 71,91; H, 7,67; N, 4,71%.

Sección farmacológica

Se utilizaron ratas machos de la cepa *Sprague-Dawley* de 150 a 250 g de peso corporal, mantenidas bajo períodos alternativos de luz y oscuridad, con libre acceso al agua y alimento estándar (Ratarina®, Protinal). Cinco días antes del experimento se les implantó a las ratas, bajo anestesia con xilacina (Setton® al 2%) (1 mg/Kg; i.p.) y relajación con ketamina, una cánula metálica en el ventrículo lateral-derecho y en el estriado anterior derecho, según las coordenadas: antero-posterior -0,40 mm del Bregma; 1,2 mm lateral (ICV) (14) y anteroposterior + 1,2; lateral = +2,8; ventral = -5,5 (IE) [19, 20]. Las cánulas, empleadas como guía para la introducción de la aguja de inyección ICV e IE, se fabricaron utilizando inyectoras 20G con un largo inferior a 4 mm, fijadas al cráneo permanentemente mediante acrílico y cemento plástico. Para las pruebas de estereotipia se preparó una solución de las drogas patrones de apomorfina (APO-go PEN 10 mg/mL, solución inyectable), haloperidol (Haldol 50 mg/mL, solución inyectable, JANSSEN PHARMACEUTICA) y ziprasidona (Geodon, polvo para solución inyectable, laboratorios Pfizer), disueltas en solución salina e inyectadas por vía intraperitoneal a la dosis de 1 mg/Kg de peso corporal. Los compuestos **12-15** se disolvieron en solución isotónica de NaCl y se inyectaron 5 µL en el ventrículo lateral derecho (ICV) y en el estriado anterior derecho (IE); para ello se empleó una jeringa Hamilton de 10 µL provista de un tope, para aplicación precisa del compuesto. A un grupo de ratas canuladas se le realizó una lesión con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) (112 mM, pH = 7,4). La solución neurotóxica fue infundida en el ventrículo lateral-derecho (ICV), con la ayuda de una inyectora Hamilton de 10 µL a una dosis de 200 µg/5µL. Para conocer si los compuestos **12-15** inducen en las ratas conductas estereotipadas, es decir, una actividad motora repetitiva y sin propósito, las observaciones se realizaron introduciendo a cada animal en una caja de observación de acrílico transparente con las dimensiones: 32 × 28 × 28 cm. Para cada una de las pruebas se utilizaron grupos de cuatro animales, y se evaluaron las siguientes conductas: lamidas, roídas (mordidas), olfateos y acicalamientos. Antes de la medición de la conducta estereotipada, los animales se introdujeron en la caja de observación y se dejaron por un período de 15 minutos para que se habituaran a la misma. Los datos recolectados se registraron empleando una computadora dotada de un software para contar el número de movimientos estereotipados. Las observaciones se hicieron por 60 minutos, divididos en 10 intervalos de 6 minutos cada uno [14-16]. Los compuestos en estudio se inyectaron de manera individual para cada grupo de prueba, a las dosis de 50 µg/5µL. Posteriormente, se evaluó la conducta estereotipada inducida por estos compuestos, en los grupos de ratas pretratadas con haloperidol (0,2 mg/Kg. PC., i.p.), un conocido antagonista de los receptores dopaminérgicos y con la ziprasidona (dosis de 1 mg/Kg. PC., i.p.) un antipsicótico atípico; para lo cual, se procedió a inyectar cada una de estas drogas 15 minutos antes de la administración (ICV) del compuesto

evaluado. Con respecto al grupo de ratas canuladas a las cuales se les practicó la lesión con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) a nivel (ICV) e (IE) [19, 20], se le administró por estas vías los compuestos **12-15** a la dosis de 50 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ E.E.M. La significancia de los resultados se analizó mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Newman-Keul [21]. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. El análisis de los resultados y la elaboración de los gráficos se realizaron empleando el programa GraphPad Prism versión 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se demuestra que la administración ICV de los compuestos **12**, **13**, **14** y **15** como mezclas racémicas, bajo la dosis de 50 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$, incrementaron significativamente las conductas estereotipadas de lamidas, olfateos y acicalamientos, mientras que el compuesto **15** se aumentó únicamente las lamidas y los acicalamientos. Las conductas estereotipadas mostradas en todos los compuestos fueron bloqueadas por el antipsicótico típico haloperidol. El pretratamiento con la ziprasidona, incrementó significativamente las lamidas y los acicalamientos inducidos por los compuestos **12**, **13**, **14** y **15**; mientras que, por el contrario, las roídas fueron bloqueadas. La desneriación química mediante el uso de la neurotoxina 6OH-dopamina (6OHDA) se realizó a nivel ICV e IE, y se observó un incremento significativo en lamidas, olfateos y acicalamientos en los cuatro compuestos evaluados; sin embargo, el compuesto **15** mostró un aumento significativo en las roídas (figuras 5-8). Es bien conocido que la estereotipia es el principal componente de varios desórdenes psiquiátricos, incluidos el autismo infantil [22] y la esquizofrenia [23]. Se ha establecido que la estereotipia (olfateos y roídas) es un comportamiento dependiente de la dopamina y el sustrato neural del comportamiento estereotipado inducido por la apomorfina en animales, se debe a las proyecciones dopaminérgicas de la región de los núcleos caudado y putamen [24]. La apomorfina es conocida por ser un agonista mixto de los receptores de dopamina D_1 - D_2 . La activación de los receptores de dopamina D_1 - D_2 sobre el núcleo estriado es expresada como la respuesta de un comportamiento excesivo y repetitivo (estereotipia) [22-26]. Es decir, que la activación de los receptores dopaminérgicos en el sistema límbico expresa la conducta estereotipada de lamidas y acicalamientos, mientras que los olfateos y las roídas son respuestas a la activación de los receptores en el sistema extrapiramidal.

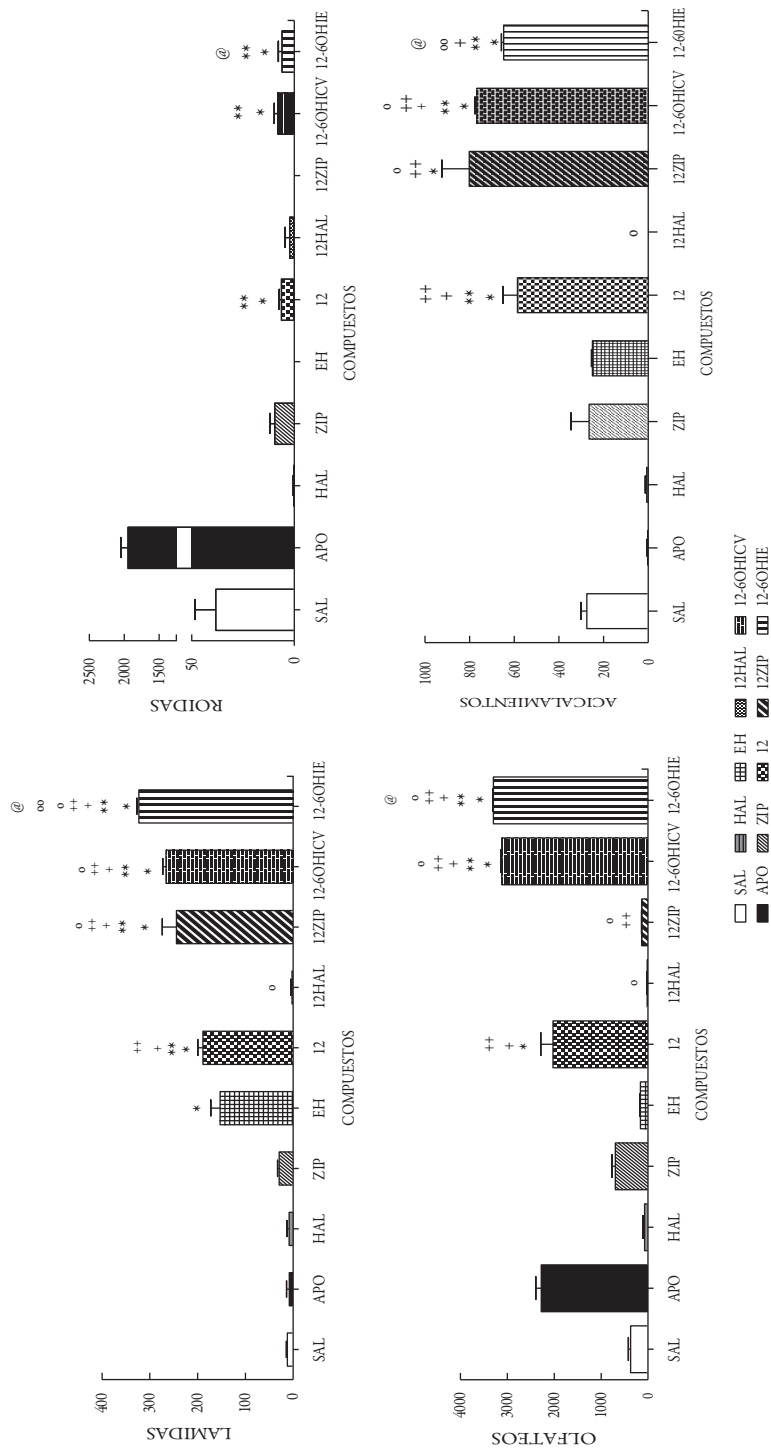


Figura 5. Efecto del compuesto 12 a la dosis de 50mg/5ml sobre la conducta estereotipada en ratas. En las ordenadas, la sumatoria de las conductas medidas. En las abscisas, los compuestos probados. Las observaciones se realizaron por 1 hora. Los resultados se expresaron como promedio $\pm$ cep de cuatro mediciones independientes. Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de Newman Keuls. * diferencia significativa (ds) vs sal; ** ds vs apomorfin (APO); ++ ds vs ziprasidona (ZIP); ° ds vs 12; °° ds vs 12-60HICV; @ ds vs Enfermedad de Huntington (EH). $p < 0,001$.

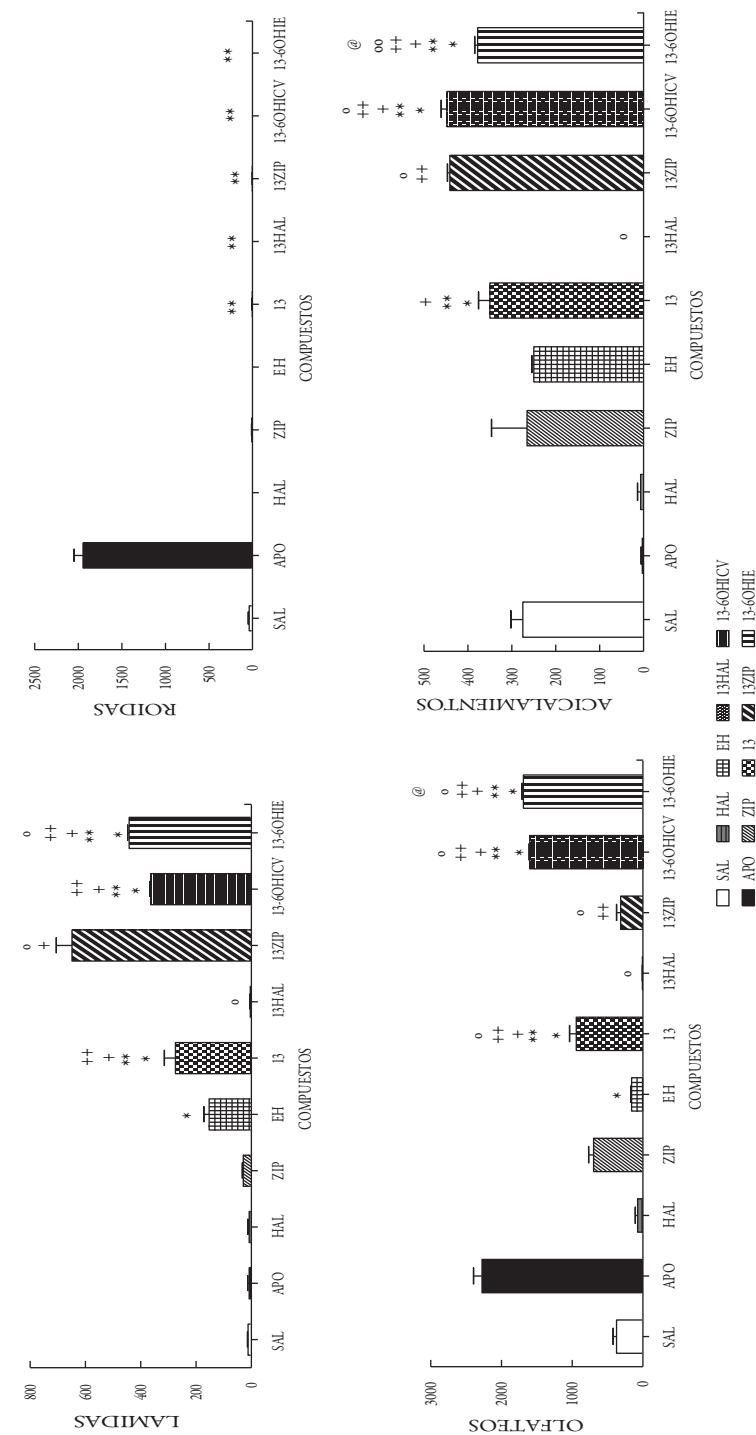


Figura 6. Efecto del compuesto 13 a la dosis de 50mg/5ml sobre la conducta estereotipada en ratas. En las ordenadas, la sumatoria de las conductas medidas. En las abscisas, los compuestos probados. Las observaciones se realizaron por 1 hora. Los resultados se expresaron como promedio $\pm$ error de cuatro mediciones independientes. Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de Newman Keuls. * diferencia significativa (ds) vs sal; ** ds vs apomorfina (APO); + ds vs haloperidol (HAL); ++ ds vs ziprasidona (ZIP); ° ds vs 13; ° ds vs 13-6OHICV; @ ds vs Enfermedad de Huntington (EH). $p < 0.001$.

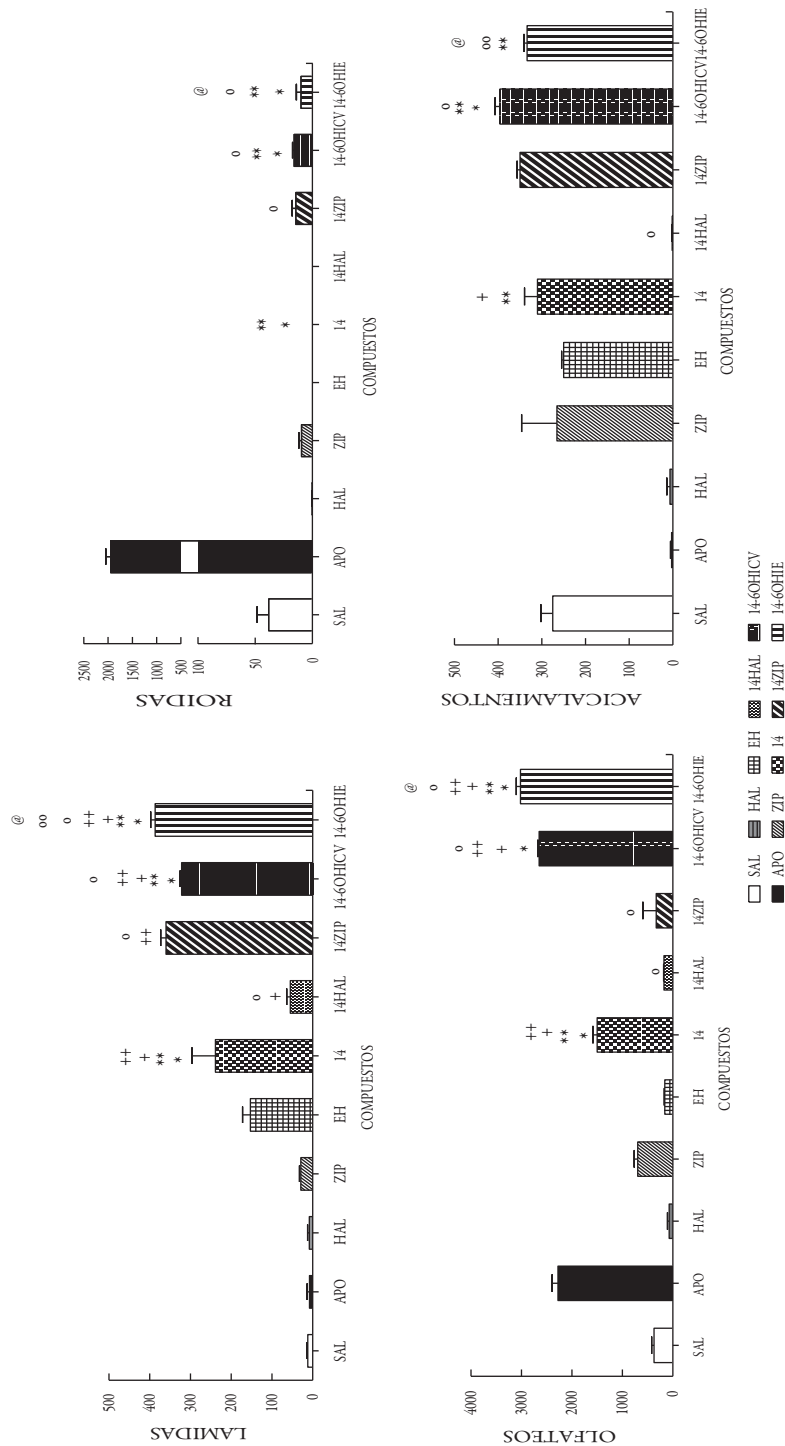


Figura 7. Efecto del compuesto 14 a la dosis de 50mg/5ml sobre la conducta estereotipada en ratas. En las ordenadas, la sumatoria de las conductas medidas. En las abscisas, los compuestos probados. Las observaciones se realizaron por 1 hora. Los resultados se expresaron como promedio $\pm$ error de cuatro mediciones independientes. Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de Newman Keuls. * diferencia significativa (ds) vs sal; ** ds vs apomorfin (APO); ++ ds vs haloperidol (HAL); + ds vs ziprazidona (ZIP); ° ds vs 14; °°ds vs 14-6OHICV; @ ds vs Enfermedad de Huntington (EH). $p < 0,001$.

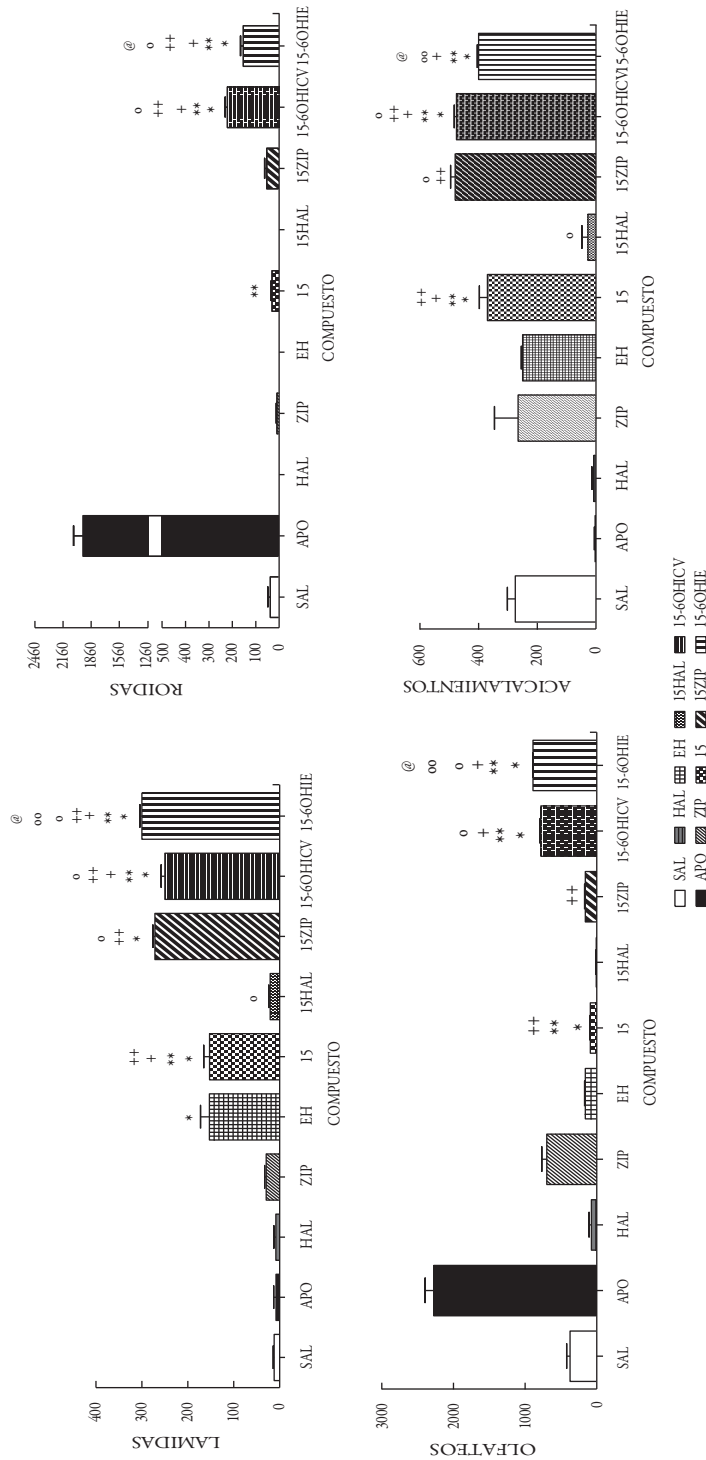


Figura 8. Efecto del compuesto 15 a la dosis de 50mg/5ml sobre la conducta estereotipada en ratas. En las ordenadas, la sumatoria de las conductas medidas. En las abscisas, los compuestos probados. Las observaciones se realizaron por 1 hora. Los resultados se expresaron como promedio $\pm$ error de cuatro mediciones independientes. Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de Newman Keuls. * diferencia significativa (ds) vs sal; ** ds vs apomorfina (APO); + ds vs haloperidol (HAL); ++ ds vs ziprasidona (ZIP); 0 ds vs 15; 00 ds vs 15-60HICV; @ ds vs Enfermedad de Huntington (EH). $p < 0,001$.

Nuestros resultados parecen indicar que la acción central de los compuestos **12-15** involucra la participación de mecanismos dopaminérgicos cerebrales. En efecto, la administración ICV de dichos compuestos produjo respuestas estereotipadas significativas, indicando una posible acción agonística de estos compuestos. Dicha acción agonística se ratifica por el hecho de que el pretratamiento con haloperidol fue capaz de bloquear completamente las conductas estereotipadas inducidas por los compuestos en estudio. Por otra parte, la observación de que los compuestos **12-15** inducen en el pretratamiento con ziprasidona un incremento significativo en las lamidas, los acicalamientos y bloqueo en los olfateos, indica un comportamiento similar a los reportados para otros agonistas dopaminérgicos al ser coadministrados con ziprasidona o la clozapina en ratas [22, 23]. Es bien conocido que la ziprasidona incrementa selectivamente la liberación de dopamina en la región de la corteza prefrontal (sistema mesocortical), cuando se activan los receptores 5HT_{1a} y bloquean los 5HT_{2a}. También la ziprasidona bloquea al receptor D₂. Fundamentados en esto inferimos que los compuestos evaluados que actúan como agonistas dopaminérgicos, interactúan con sus receptores en el sistema límbico (acicalamientos y lamidas) y en los ganglios basales (olfateos). Desde que la ziprasidona ejerce un aumento del tono dopaminérgico sobre las neuronas de la corteza prefrontal, se asocia dicha acción con el incremento significativo de las conductas estereotipadas propias del sistema límbico observado cuando los compuestos **12-15** interactúan en este sistema. Contrariamente, la activación de los receptores dopaminérgicos en los ganglios basales inducida por los compuestos **12-15** (conducta olfateos) fue bloqueada, posiblemente debido a la acción inhibitoria del receptor D₂ de la ziprasidona. Estos resultados están en concordancia con los reportados previamente por nuestro grupo, en otros compuestos sintetizados y evaluados farmacológicamente donde la coadministración con ziprasidona aumentó las lamidas y los acicalamientos [14-16].

La respuesta estereotipada de los compuestos **12-15** podría ser el resultado de una acción presináptica (indirecta) o postsináptica (directa). En la acción presináptica de los compuestos, podrían involucrar la depleción del neurotransmisor o el bloqueo de algún receptor dopaminérgico presináptico que regule la secreción del neurotransmisor; mientras que la acción postsináptica implicaría la interacción con su propio receptor. Con el fin de tener una aproximación sobre el posible mecanismo de acción de los compuestos **12-15**, se procedió a la desnervación química de las neuronas dopaminérgicas mediante el uso de una neurotoxina, la 6-OHDA al administrarse por vía ICV [15, 16, 20, 27]. Nuestros hallazgos demuestran que la desnervación dopaminérgica central incrementa significativamente la acción agonista ejercida por los compuestos evaluados en las tres conductas (lamidas, olfateos y acicalamientos) y solo las roídas se incrementaron por la acción del compuesto **15**, lo que parece indicar que los mismos son mecanismos dopaminérgicos independientes de su acción presináptica, es decir, actúan a nivel postsináptico, tanto en los ganglios basales como en el sistema límbico.

Por otro lado, la acción de los compuestos **12-15** cuando se administraron por vía intraestriatal (IE) en el grupo de ratas enfermas (EH), mostraron cambios significativos sobre las alteraciones conductuales y locomotoras propias de la enfermedad, ya que se observaron aumentos significativos en las tres conductas evaluadas (lamidas, olfateos y acicalamientos), y solo las roídas aumentaron para el compuesto **15**, al compararse con el grupo de ratas enfermas. Este grupo de ratas con EH, antes de recibir el tratamiento de los compuestos **12-15**, mostraron cambios significativos en las cuatro conductas estereotipadas estudiadas, observándose un aumento significativo en las lamidas y disminución en las tres conductas restantes. Con esto se demostró el daño estriatal ocasionado por la 6-hidroxidopamina, al provocar la degeneración neuronal que conlleva daños motores y cognitivos, comparables a los que se reportan en pacientes con la enfermedad de Huntington. Cuando las ratas se aislaron en su hábitat se observaron daños motores y cognitivos, los primeros produjeron temblor, acinesia, rigidez, postura en flexión y alteración de los reflejos posturales, mientras que los segundos se manifestaron con agresividad, temor y pérdida de la memoria. Además, se observó la reducción de la capacidad de supervivencia al no mostrar interés en la ingesta de alimento y agua. Estos síntomas son el resultado de las alteraciones ejecutivas y organizativas donde se altera la capacidad de planificación, organización, la toma de decisiones y la flexibilidad mental.

Es bien conocido que las alteraciones que conducen a la EH, se producen por un desequilibrio entre las vías (directa e indirecta) que controlan el movimiento en los ganglios basales. La vía directa activa los movimientos voluntarios, mientras que la vía indirecta inhibe la aparición de los componentes involuntarios en el movimiento. Un adecuado equilibrio entre las dos vías, producen los movimientos normales. En la EH ocurre la degeneración de las neuronas estriatopallidales en los circuitos de los ganglios basales en la fase hiperkinética, prevaleciendo así la vía directa sobre la vía indirecta [8, 9]. Este desequilibrio observado en nuestros experimentos fue contrarrestado cuando se les administró a las ratas enfermas la dosis estudiada de los compuestos **12-15**, lográndose así desaparecer los síntomas cognitivos y motores de la enfermedad (después de la inyección intraestriatal). La supervivencia de este grupo de ratas tratadas fue de 15 días, y mostraron un comportamiento de ratas normales. Estos resultados están en concordancia con otros compuestos sintetizados y evaluados por nosotros [19].

La actividad farmacológica mostrada por los compuestos **12-15** se debe a la incorporación de las estrategias del diseño de profármacos, al hibridar la molécula base con dos fragmentos que contengan el farmacóforo parcial del receptor dopaminérgico, a través de un enlace covalente. En una porción está presente el fragmento del 2-aminoindano **16** y en la otra, están presentes las fenilacetonas **17 a-d** sustituidas sobre el anillo aromático bajo las formas mono y dimetoxiladas. Los resultados farmacológicos nos permiten proponer que los compuestos **12-15**, al ser administrados ICV, podrían sufrir

una activación metabólica, por medio de una reacción de hidroxilación aromática sobre el núcleo 2-aminoindano y el producto metabólicamente activo guardaría una estrecha relación con el farmacóforo dopaminérgico (fragmento *m*-hidroxifeniletilamina), necesario para ejercer la actividad farmacológica (figura 9). Cabe destacar que los productos finales solo poseen el farmacóforo parcial dopaminérgico (fragmento feniletilamino) sobre el anillo indano y bajo esta forma no son capaces de interactuar directamente sobre su receptor, por lo que estos compuestos para ejercer su actividad postsináptica agonística, deben activarse enzimáticamente y así dar origen a la forma activa para interactuar sobre sus receptores. Por otro lado, el fragmento *N*-aralquil, en los compuestos estudiados, puede sustituirse o no por grupos no hidroxílicos, ya que la sola incorporación de al menos un grupo OH sobre el anillo bencénico del fragmento aralquil generaba compuestos con actividad dopaminérgica central como antagonistas [10-14]. Es decir, nuestros resultados están en concordancia con lo antes expuesto, ya que la incorporación de los grupos metoxi, sobre el anillo aromático del grupo *N*-aralquil o la no incorporación de algún grupo funcional, facilitan la interacción hacia su receptor y desencadenan una respuesta agonística. Iguaes resultados se observaron con los compuestos **9** y **11** [15, 16].

De acuerdo con los resultados farmacológicos, los compuestos estudiados se comportan como profármacos, ya que una vez administrados se requiere un tiempo de espera para iniciar la evaluación. Durante ese lapso, las formas inactivas de los compuestos **12-15** dentro del organismo o sistema biológico, sufren una reacción metabólica (enzimática) capaz de incorporar el grupo OH (fenólico) en las posiciones 4 (análogo del rotámero alfa) **12-15 A** y 6 (análogo del rotámero beta) **12-15 B** del anillo indano, formándose así dos posibles metabolitos activos que contienen el farmacóforo total dopaminérgico (fragmento *m*-hidroxifeniletilamino). Los resultados experimentales confirman su acción agonista a través de mecanismos dopaminérgicos postsinápticos, con previa bioactivación metabólica que estaría en concordancia con nuestros resultados ya reportados (figura 8) [11-14, 16]. De hecho, la incorporación del fragmento farmacofórico “*m*-hidroxifeniletilamino” en el núcleo indano, permite que interactúe en el receptor postsináptico, tal y como lo demuestra el aumento significativo en las cuatro conductas estereotipadas en las ratas desnervadas con 6-OHDA.

En resumen, los compuestos **12-15** se diseñaron mediante las estrategias químico-medicinales, que contienen las aproximaciones farmacofóricas de los profármacos. Su obtención se realizó por medio de las rutas clásicas contenidas en la síntesis orgánica y su evaluación farmacológica reveló que poseen actividad agonística a través de la activación de los mecanismos dopaminérgicos centrales, como potenciales antihuntington y antipákinson.

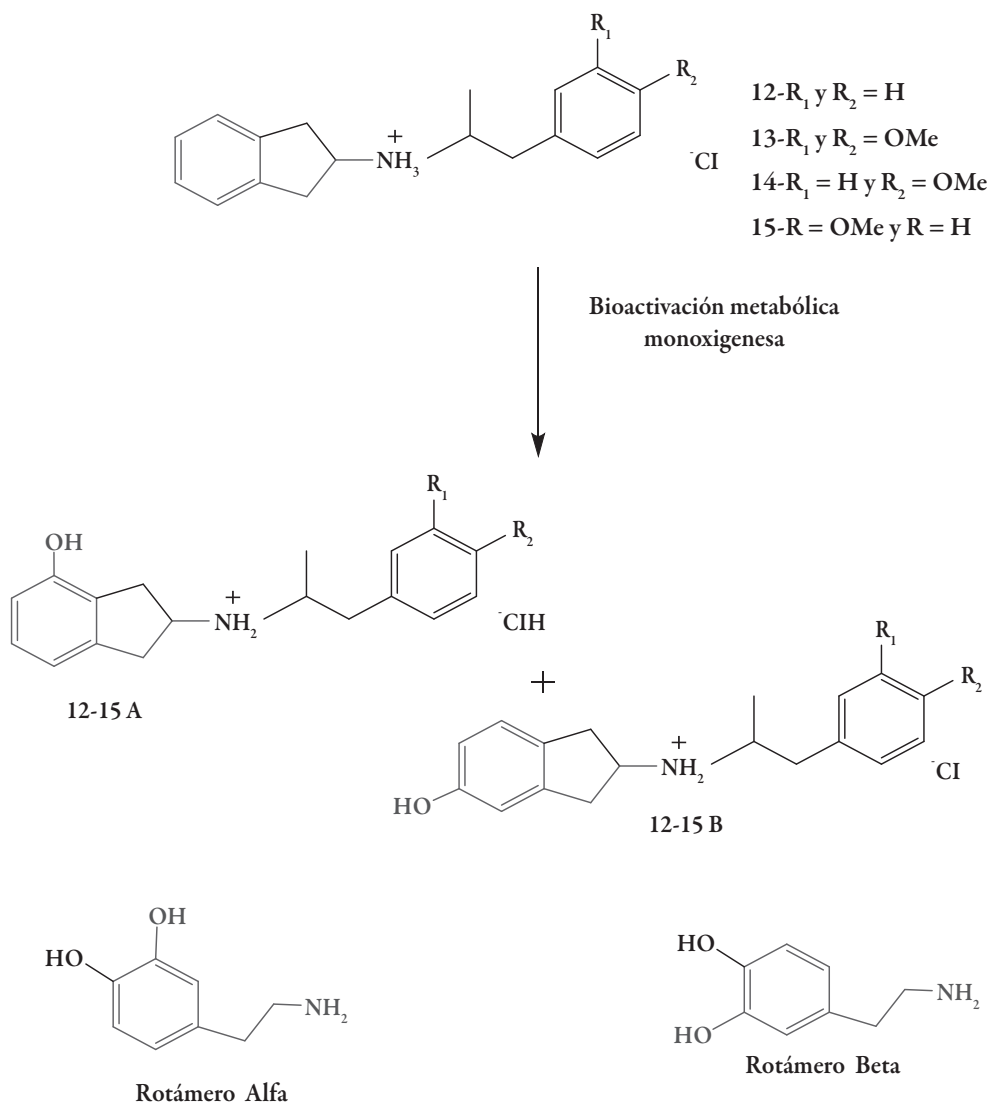


Figura 9. Posible bioactivación metabólica de los profármacos 12-15.

AGRADECIMIENTOS

El autor* dedica este manuscrito a la memoria del Dr. Leonardo José Rodríguez Espejo†.

Este trabajo fue subvencionado por el Programa VAC-CONDES-CC-0239-17.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no hay ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. J.A. Montaña-Arias, G. Flores, R. Bahena-Trujillo, Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central, *Rev. Biomed.*, **11**, 39 (2000).
2. B. Sachar, R. Zuk, H. Gazawi, P. Ljubuncic, Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: Implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders, *Biochem. Pharm.*, **67**(10), 1965 (2004).
3. J.M. Beaulieu, R.R. Gainetdinov, The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors, *Pharmacol. Rev.*, **63**, 182 (2011).
4. A. Zhang, J. Neumeyer, R. Baldessarini, Recent progress in development of dopamine receptor subtype-selective agents: Potential therapeutics for neurological and psychiatric disorders, *Chem. Rev.*, **1**(28), 274 (2007).
5. T.W. Rall, A.S. Nies, P. Taylor, "Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica", Editorial Médica Panamericana, México, 1991, vol. 8, pp. 458-461.
6. J. Neumeyer, G. Arana, V. Ram, N. Kula, R. Baldessarini, Aporphines. 39. Synthesis, dopamine receptor binding, and pharmacological activity of (R)-(-)- and (S)-(+)-2-hydroxy-apomorphine, *J. Med. Chem.*, **25**(8), 990 (1982).
7. L. Brichta, P. Greengard, M. Flajolet, Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: Targeting neurotransmitter systems, *Trends Neurosci.*, **36**(9), 543 (2013).
8. E. Gatto, Enfermedad de Huntington, *Rev. Neuropsiquiatr.*, **65**, 202 (2002).
9. G. Encinosa, Corea de huntington, *Rev. Cubana Genet. Human.*, **3**, 1 (2001).
10. J.E. Ángel-Guío, L. Rodríguez, Y. Medina, H. Suárez-Roca, B. Migliore de Ángel, A. Israel, J. Charris, S. López, J. Caldera, Conformational theoretical study of substituted and non-substituted *N*-aralkyl-2-aminoindans and its relation with dopaminergic activity, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **636**(1-3), 1 (2003).
11. J.E. Ángel Guío, J. Charris, A. Israel, B. Migliore de Ángel, H. Suárez-Roca, M. Garrido, S. López, E. Díaz, R. Ferrer, E. Michelena de Báez, L. Rodríguez, J. Silva, A. Moronta, G. Espinoza, L. Quintero, Perfil dopaminérgico del compuesto 2-aminoindano-*N*-aralquil sustituido, *Arch. Venezol. Terap. Farmacol.*, **23**, 136 (2004).

12. S. Andújar, F. Garibotto, B. Migliore de Ángel, J.E. Ángel-Guío, J. Charris, R.D. Enriz, Molecular recognition and binding mechanism of *N*-aralkyl substituted 2 aminoindans to the dopamine D₂ receptor. A theoretical study, *J. Argent. Chem. Soc.*, **94**, 1 (2006).
13. J.E. Ángel, Una compilación en el diseño y evaluación farmacológica preliminar de nuevos compuestos con actividad dopaminérgica central, *Invest. Clin.*, **49**(1), 71 (2008).
14. J.E. Ángel, S. Andújar, B. Migliore de Ángel, J. Charris, A. Israel, H. Suárez-Roca, S. López, M. Garrido, E. Cabrera, G. Visbal, C. Rosales, F. Suvire, R. Enriz, Synthesis, dopaminergic profile and molecular dynamics calculations of *N*-Aralkyl substituted 2-aminoindans, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 3233 (2008).
15. J.E. Ángel, R.E. Ferrer, N.C. Urdaneta, N. Porta, L.Ch. Rodríguez, C.C. Rosales, G.A. Espinoza, L.B. Ángel, K. Balza, L.E. Perdomo, A.R. Faría, A.S. Dabian, M.V. Zapata, A.R. Linero, G.A. Acurero, A. Israel, M.R. Garrido, H. Suárez-Roca, B. Migliore de Ángel, S.E. López, J. Charris, M.M. Ramírez, Novedosos agentes dopaminérgicos centrales derivados del 2-aminoindano- 4,7 disustituido atípico. Síntesis y perfil farmacológico central, *Invest. Clin.*, **56**(2), 137 (2015).
16. L.Y. Montero, M.V. Velásquez, J.A. Caldera, M. Vera, C.C. Blanco, L.B. Ángel, B.C. Migliore de Ángel, J.E. Charris, A. Israel, S.E. López, R. Izquierdo, J.G. Ortega, M.M. Ramírez, J.E. Ángel, Síntesis y evaluación farmacológica de los novedosos agentes dopaminérgicos centrales análogos del *N*-dicloroaraquil-2-aminoindano, *Rev. Fac. Farm., UCV*, **81**(1, 2), (2018). En prensa.
17. J. Charris, J. Pérez, J. Domínguez, J.E. Ángel, Z. Duerto, M. Salazar, H. Acosta, *N*-aralkyl substitution of 2-aminoindans. Synthesis and their inotropic and chronotropic activity in isolated guinea pig atria, *Arzneimittel-Forsch*, **47**(11), 1208 (1997).
18. J.A. Vera, "Síntesis de análogos del 2-aminoindano con posible actividad farmacológica", trabajo especial de grado, Universidad Central de Venezuela, 1984, p. 126.
19. L.B. Ángel, K. Balza, L.E. Perdomo, A.S. Dabian, A.R. Faría, A.R. Linero, B. Migliore de Ángel, H. Suárez-Roca, J. Charris, A. Israel, M.M. Ramírez de Bracho, J.E. Ángel, Síntesis y evaluación farmacológica preliminar de nuevos compuestos quinolínicos con actividad anticorea de huntington, *Rev. Fac. Farm., UCV*, **78**(1-2), 94 (2015).

20. L. Francis-Turner, A.J. Bergado, R.J. Bergado, Efectos del factor de crecimiento nervioso (ngF) sobre la conducta en un modelo experimental de corea de huntington en ratas, *Rev. Tumbaga*, **1**(1), 55 (2006).
21. G. Snedecor, W. Cochran, "Statistical methods", Iowa State University Press, Amer. Ser. Printing., 1982, vol. 7, p. 534.
22. H. Rollema, 5HT_{1a} receptor activation contributes to ziprasidone-induced dopamine release in the rat prefrontal cortex, *Biol. Psychiatry*, **48**, 229 (2000).
23. B. Costall, C.D. Marsden, R.J. Naylor, C.J. Pycock, Stereotyped behavior patterns and hyperactivity induced by amphetamine and apomorphine after discrete 6-hydroxydopamine lesions of extrapyramidal and mesolimbic nucleus, *Brain Res.*, **123**, 89 (1977).
24. B. Costall, R.J. Naylor, J.G. Cannon, T.J. Lee, Differentiation of the dopamine mechanisms mediating stereotyped behavior and hyperactivity in the nucleus accumbens and caudate-putamen, *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**(6), 337 (1977).
25. S. Kapur, P. Roy, J. Daskalakis, G. Remington, R. Zipursky, Increased dopamine D₂ receptor occupancy and elevated prolactin level associated with addition of haloperidol to clozapine, *Am. J. Psychiatry*, **158**, 311 (2001).
26. L. Bardin, M.S. Kleven, C. Barret-Grévoz, R. Depoortere, A. Newman-Tancredi, Antipsychotic-like vs. cataleptogenic actions in mice of novel antipsychotics having D₂ antagonist and 5-HT_{1A} agonist properties, *Neuropsychopharmacology*, **31**(9), 1869 (2006).
27. M.R. Luquin, Modelos experimentales de enfermedad de Parkinson, *Rev. Neurol.*, **31**(1), 60 (2000).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO:

G. Suárez-Bozo, M. Sanguino-Díaz, G. Lucena, M. Ocampo-Hernández, L. Rodríguez-Villasmil, K. Balza-Jiménez, et al., Agentes dopaminérgicos centrales análogos N-aralquil metoxilados del 2-aminoindano, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(2), 233-253 (2018).



Acetilación del almidón de millo (*Pennisetum glaucum*) y evaluación de su aplicación como posible excipiente

Alexander Sulbarán¹, Germán E. Matiz¹, Yolima Baena^{1*}

¹ Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Grupo de investigación Tecnología de Productos Naturales (Tecprona), Ciudad Universitaria, carrera 30 No. 45-03, Bogotá, D. C., (111311), Colombia.

*Correo electrónico: ybaena@unal.edu.co.

Recibido para evaluación: 19 de diciembre de 2017

Aceptado para publicación: 5 de abril de 2018

RESUMEN

Los almidones nativos se utilizan en la fabricación de productos farmacéuticos, cosméticos y de alimentos. Tienen limitaciones que pueden mejorarse mediante modificaciones físicas, químicas o enzimáticas. Los almidones de millo y maíz (referencia) se modificaron por acetilación a tres niveles. Se evaluaron fisicoquímicamente y farmacotécnicamente, para comparar el comportamiento de los almidones modificados frente al nativo. El almidón de maíz alcanzó mayores índices de sustitución. A mayor acetilación, la capacidad del almidón de incorporar agua mejoró, reflejándose en índices de hinchamiento y de sorción más altos, así como un incremento en la viscosidad. Se evidenció una mayor estabilidad de los geles del almidón de millo con menor tendencia a la sinéresis. La temperatura de gelatinización disminuyó a medida que aumentaba la acetilación, lo que permitiría obtener geles más rápido y con menor consumo de energía. El perfil de cristalinidad no se vio modificado sustancialmente. No se evidenciaron cambios importantes en las propiedades farmacotécnicas de los almidones modificados frente a los nativos. La captación de agua en el estado sólido favoreció la rápida desintegración en tabletas. Estos aspectos muestran un potencial del uso del almidón de millo acetilado en la industria farmacéutica y de alimentos como agente gelificante y desintegrante.

Palabras clave: *Pennisetum glaucum*, *Zea mays*, almidones modificados, acetilación.

SUMMARY

Acetylation of millet starch (*Pennisetum glaucum*) and evaluation of its application as a possible excipient

Native starches are very useful in the manufacture of pharmaceutical, cosmetic and food products. However, they have important limitations, which can be improved by physical, chemical or enzymatic modifications. Millet and maize starches (reference), were modified at three levels. Physicochemical and pharmaceutical tests were applied to evaluate changes in behavior. Under the same conditions, corn starch achieved higher substitution rates. Acetylation of starches, in more extensive, causes changes in the ability of the starch to trap water. The rates of swelling (swelling power) and sorption increase, as viscosity. There were an improve behavior in the characteristics of the gels and the water uptake. This behavior improves stabilization of gels, with less tendency to syneresis. The gelatinization temperature decreases as acetylation increases. By reducing the gelatinization temperature, gels are obtained in less time and with less energy consumption. The crystallinity profile do not change substantially. There were no significant changes in the pharmaceutical properties of the modified starches compared to the native ones. Higher water uptake in the solid state favors rapid disintegration in tablets. These aspects show a potential use of acetylated millet starch in the pharmaceutical and food industry as a gelling and disintegrating agent.

Key words: *Pennisetum glaucum*, *Zea mays*, starch, acetylation.

INTRODUCCIÓN

El almidón es uno de los materiales de mayor utilidad en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética [1]. Gracias a sus propiedades fisicoquímicas, el almidón nativo (en su estado natural) es una excelente materia prima para modificar la textura y consistencia de los alimentos. En función de estas propiedades es empleado en la preparación de sopas, helados, gelatinas y conservas [2]. En la industria farmacéutica, se emplea como excipiente, cumpliendo funciones como desintegrante, diluyente y aglutinante en la elaboración de distintas formas farmacéuticas y en la fabricación de formas cosméticas como polvos. Sin embargo, la necesidad de mejorar sus propiedades fisicoquímicas, estabilidad y extender sus usos, hace necesaria su modificación por distintos métodos físicos, químicos o enzimáticos [3].

El millo, *Pennisetum glaucum*, es una gramínea anual originaria de las zonas subtropicales y tropicales de África, ampliamente sembrada como un cultivo de subsistencia en el trópico semiárido de África y la India, en donde ocupa un área cercana a los 30 millones de hectáreas [4, 5]. En Colombia se produce en climas cálidos y templados hasta los 1.800 metros sobre el nivel del mar, se encuentra en departamentos como Atlántico, Meta y Casanare. El millo es un cultivo rústico, resistente a las sequías, temperaturas altas y suelos arenosos con bajo contenido de materia orgánica. Su valor nutricional, especialmente su contenido de proteínas, grasas y minerales, es comparable o superior a otros granos de cereal [4, 5].

En el marco del desarrollo del presente trabajo, se realizaron modificaciones químicas al almidón nativo de millo (*Pennisetum glaucum*), como fuente no tradicional de almidón, mediante la reacción de acetilación, con el fin de evaluar la posibilidad de mejorar algunas de las propiedades del almidón nativo, para su posible aplicación en los campos farmacéutico, cosmético o alimenticio.

METODOLOGÍA

A continuación, se presentan los ensayos realizados tanto para el almidón de millo modificado y sin modificar, como para el almidón de maíz empleado como punto de referencia de comparación.

Extracción del almidón

El almidón usado para el desarrollo del presente estudio, se obtuvo a partir del millo (*Pennisetum glaucum*), adquirido en el mercado público del municipio de Sabanalarga, departamento del Atlántico, Colombia. Se escogió el material fresco, entero, con adecuadas características organolépticas. Una vez disponible el material, se inició con un proceso de molienda para partir el grano, sin disminuir inicialmente demasiado su tamaño. Se retiró la cáscara de forma manual, lanzando el material al aire y recibéndolo en una bandeja para separar la cascarilla del grano molido. Después de este proceso, se seleccionó el material limpio, sin presencia de cáscaras o partículas extrañas, para molerse nuevamente hasta el menor tamaño de partícula posible (impalpable). Posteriormente, se realizaron lavados sucesivos retirando las cáscaras y el material extraño suspendido. Se filtró, lavándose el material sólido con agua y se realizó el último lavado con alcohol USP, para evitar la contaminación microbiológica. Se llevó a un horno de secado a 50 °C por 12 horas (estufa, Doa-p704-aa, E.U.), el material seco se pasó a través de un tamiz malla No. 40 y se almacenó en un recipiente hermético hasta su uso [6].

Acetilación, determinación de grupos acetilo y grado de sustitución

El almidón nativo fue acetilado a tres niveles variando las cantidades de anhídrido acético adicionadas (grado reactivo, J.T. Baker - 5, 10 y 15 mL para los niveles I, II y III, respectivamente), empleando el método descrito por Wolff *et al.* [7], con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión que contenía 40 g de almidón nativo (*Pennisetum glaucum*) en 100 mL de agua destilada, ajustando el pH a 8,5 (pH-metro, Mettler Toledo, Suiza) con una solución de NaOH 3,0% (grado reactivo, Merck, Alemania), con agitación constante (plancha de agitación, talboys hotplate-stirrer, E.U.). Se procedió a adicionar lentamente (gota a gota) el volumen de anhídrido acético definido, ajustando simultáneamente el pH entre 8,0-8,5 con el mismo hidróxido, dejando estabilizar el sistema por 10 minutos. Seguidamente, se ajustó el pH del sistema a 5, con una solución HCl 0,5 N (grado reactivo, Merck, Alemania), se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos y el residuo se lavó tres veces con agua destilada y finalmente con alcohol USP, con centrifugaciones sucesivas. El almidón modificado obtenido se secó en un horno de bandejas (estufa, Doa-p704-aa, E.U.) a 40 °C por 12 horas. Para la verificación de la reacción, se realizaron espectros IR de los almidones nativos y acetilados (Spectrum BX, Perkin Elmer, E.U.). El espectro se hizo en un intervalo de longitud de onda de 400-4.000 cm⁻¹.

Para las determinaciones del porcentaje de acetilación (PA) y el grado de sustitución (GS), se empleó la técnica de saponificación alcalina descrita por Genung y Rusell, con modificaciones [9]. En un matraz de 250 mL se adicionaron 1,0 g del almidón acetilado (base seca), 50 mL de una solución de etanol-agua (70% v/v), y luego 50 mL de una solución de KOH (grado reactivo, Merck, Alemania). La mezcla se agitó y se mantuvo a 50 °C durante 30 minutos, y posteriormente se conservó a temperatura ambiente por 72 horas con agitación ocasional. El exceso de álcali fue valorado por retroceso con una solución de HCl 0,25 N (grado reactivo, Merck, Alemania), usando fenolftaleína (grado reactivo, J.T. Baker, E.U.) como indicador. Simultáneamente se realizó un blanco con una muestra del almidón nativo siguiendo el mismo procedimiento. Los cálculos se hicieron empleando la ecuación (1).

$$PA = \frac{[(\text{mL blanco} - \text{mL muestra}) * [\text{HCl}] * 0,043] * 100}{\text{gramos de muestra}} \quad (1)$$

donde: 0,043 = mili equivalentes del grupo acetilo.

La determinación del GS, que corresponde al número promedio de grupos hidroxilo que se reemplazaron por grupos acetilo en la unidad de anhidroglucosa (UAG), se calcula empleando la ecuación (2).

$$GS = \frac{(162 * PA)}{(4300 - (42 * PA_{teórico}))} \quad (2)$$

Donde:

$PA_{teórico}$ = porcentaje de acetilos teórico.

162 = masa molar de la UAG.

4.300 = 100 × masa molar del grupo acetilo.

42 = masa molar del grupo acetilo menos 1.

Determinación del poder de hinchamiento, solubilidad y absorción de agua

Para determinar el poder de hinchamiento, solubilidad y absorción de agua, se usó el método propuesto por Tsai *et al.* [10], con algunas modificaciones. La determinación se realizó en un rango de temperatura entre 55 °C y 90 °C. Cuatro gramos de almidón se transfirieron cuantitativamente con 200 mL de agua a un balón de 300 mL de tres bocas, dentro del cual se introdujo un agitador magnético. En la boca central del balón se conectó un refrigerante, en otra un termómetro y en la tercera boca se ubicó un tapón que se removió durante el análisis, para los muestreos correspondientes. El balón se colocó sobre una plancha de calentamiento con agitación. Se hizo un control de la temperatura y se tomaron alícuotas de 10 mL cada 5 grados entre 55 °C y 90 °C, con agitación a velocidad constante permitiendo mantener el almidón en suspensión durante el calentamiento. Dichas alícuotas se colocaron en tubos de centrifuga previamente pesados. Los tubos de centrifuga con la alícuota a temperatura ambiente se pesaron nuevamente. Se centrifugaron a 2.200 rpm durante 15 minutos. El líquido sobrenadante se llevó a cápsulas de porcelana previamente taradas, secando en estufa a 60 °C hasta peso constante. Se utilizaron las ecuaciones (3), (4), (5) y (6) para los cálculos correspondientes.

$$W_1 = \frac{\text{Masa almidón en base seca}(g)}{\text{Masa almidón en base seca}(g) + \text{Volumen de disolución}(200g)} * 100 \quad (3)$$

$$W_2 = A * \frac{W_1}{100} \quad (4)$$

$$\%SS = \frac{b}{W_2} * 100 \quad (5)$$

$$PH = \frac{a * 100}{W_2 * (100 - \%SS)} \quad (6)$$

A = masa de alícuota (g).

a = masa del sedimento en el tubo (g).

b = masa del residuo en la caja de Petri (almidón solubilizado, g).

W_1 = porcentaje de almidón en base seca de la suspensión.

W_2 = almidón en cada alícuota.

% SS = porcentaje de sólidos solubles (g/g almidón).

PH = poder de hinchamiento

Determinación de la viscosidad aparente

Se prepararon dispersiones de almidón al 5% (p/v) en agua, y se colocaron inicialmente en calentamiento en un baño con agua hirviendo durante 15 minutos y luego se enfriaron a temperatura ambiente (25 °C). La viscosidad aparente de las dispersiones frías se midió a 25 °C (viscosímetro, Brookfield, E.U.) a cuatro velocidades (2, 4, 10 y 20 min⁻¹) utilizando la aguja No. 3 [11].

Determinación de la temperatura de gelatinización

El rango de temperatura de gelatinización fue determinado por calorimetría diferencial de barrido (DSC- Mettler Toledo 822e, Suiza), previamente calibrado con indio, empleando el método propuesto por Mirmoghtadaie *et al.* [8], con algunas modificaciones. Se pesaron aproximadamente 2,2 mg de muestra en un crisol de aluminio, se adicionaron 7,5 µL de agua, se selló herméticamente y se dejó equilibrar por espacio de 30 minutos antes de hacer el análisis. Transcurrido el tiempo de humectación, la muestra se sometió a un programa de calentamiento en un rango de temperatura de 10 °C a 120 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹.

Determinación de la sinéresis

La prueba de sinéresis se realizó aplicando la metodología descrita por Sodhi y Singh [12]. Una dispersión de almidón (5% p/p) gelificado a 90 °C por 30 minutos, se sometió a enfriamiento rápido en un baño de hielo hasta temperatura ambiente (25 °C). Las muestras se almacenaron por 48, 72, 96 y 168 horas a 4 °C. La sinéresis se determinó como el porcentaje de agua liberada después de centrifugar a 3.200 rpm durante 15 minutos.

Determinación de las isotermas de sorción

A las diferentes muestras se les evaluó su comportamiento de sorción, utilizando una propuesta de diseño del equipo de Enslin (figura 1), y se les aplicó la metodología propuesta por Nogami *et al.*, con modificaciones [13]. Este equipo presenta en uno de los extremos el soporte portamuestra (celda), que consta de un embudo de vidrio con

una frita sobre la que se colocó el material a evaluar. En el otro, una pipeta graduada, que se encuentra al mismo nivel superior de la frita (para evitar el efecto de la presión hidrostática). Este sistema se llenó con agua destilada (25 °C), aprovechando prácticamente la totalidad de la pipeta; la posición del fluido en ese momento constituye el punto cero de la pipeta (posición inicial). Se colocó la muestra en forma centrada en la celda del equipo. La muestra sometida al ensayo, toma líquido por capilaridad (no debe actuar ninguna otra fuerza). Se midió el volumen captado a intervalos de tiempo predeterminados.

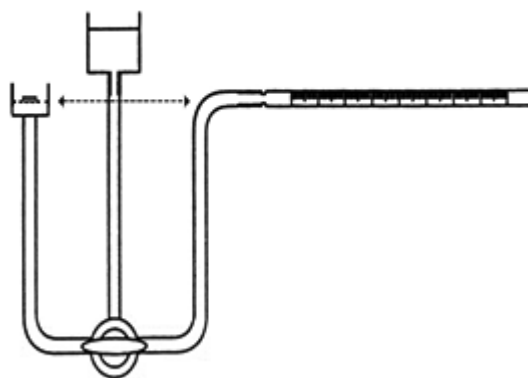


Figura 1. Representación esquemática del aparato de Enslin.

Caracterización por difracción de rayos X (DRX)

Se realizó el análisis en un rango de 10° - 70° $2\theta/\theta$, con una velocidad de barrido de $0,066^{\circ}2\theta/s$ empleando el equipo de rayos X (Panalytical Xpert Pro MPD, Holanda), y se aplicó una metodología similar a la de Ayala *et al.* [14].

Forma y tamaño de partícula

La morfología de los gránulos se determinó empleando un microscopio de barrido electrónico FEI cuanta 200, recubriendo la muestra con oro-paladio, y se utilizó la metodología descrita por Rodríguez *et al.* [15]. El tamaño se evaluó usando un equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instrument 2000S, Reino Unido), con un índice de refracción de 1,494 y precisión de $\pm 1\%$, y se aplicó la metodología descrita por Kaur *et al.* [16], con algunas modificaciones.

Densidad aparente y apisonada

Para determinar la densidad aparente se siguió una metodología similar a la indicada en la USP39 [17]. Un gramo de material, exactamente pesado, se incluyó en una probeta certificada de 5 mL, dejándolo caer libremente y tomando la lectura del volumen

ocupado. Posteriormente, el material en la probeta se sometió a vibración, después de lo cual se midió el volumen ocupado, que corresponde al volumen apisonado y es el requerido para el cálculo de la densidad apisonada.

Con los datos de densidad se calcularon el índice de Hausner y el índice de Carr [15]. Las ecuaciones involucradas en los diferentes cálculos se presentan a continuación:

$$\text{Densidad aparente} = \frac{\text{Masa de la muestra (g)}}{\text{Volumen aparente}} \quad (7)$$

$$\text{Densidad apisonada} = \frac{\text{Masa de la muestra (g)}}{\text{Volumen apisonado}} \quad (8)$$

$$\text{Índice de carr} = \frac{\text{Densidad apisonada} - \text{Densidad aparente}}{\text{Densidad apisonada}} \quad (9)$$

$$\text{Índice de Hausner} = \frac{\text{Volumen inicial}}{\text{Volumen apisonado}} \quad (10)$$

Compresibilidad

Se siguió el método de Kaplan y Wolf, empleando una prensa hidráulica (Carver Laboratory Press, E.U.) y comprimiendo cada uno de los materiales de manera independiente a una tonelada de presión. De acuerdo con esta metodología, se evaluaron las características individuales de los materiales a comprimir: dificultad de eyección, presencia de laminación, adhesión a los punzones y test de desintegración (equipo desintegración, Distek sensIR 3200, E.U.) [18].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de rendimiento obtenido para el proceso de extracción del almidón de millo, siguiendo la metodología anteriormente descrita, fue del 10,3%, después de realizar varios ensayos preliminares para mejorar el proceso. El material obtenido presentó un color blanco grisáceo, libre de material extraño, olor y textura parecida a la del almidón de maíz.

Los grados de sustitución (GS) (tabla 1) muestran que este fue mayor en la medida que se aumentó el volumen de anhídrido acético adicionado, como era de esperarse. Al comparar los resultados del almidón de millo con los del almidón de maíz, se observa un comportamiento similar en ambos casos, siendo mucho mayor el GS para el almidón de maíz.

Tabla 1. Grados de sustitución obtenidos.

Tipo de almidón	Nivel de acetilación	PA	GS
Almidón de maíz	I	18,37	0,69
	II	21,64	0,82
	III	22,79	0,86
Almidón de millo	I	1,81	0,07
	II	3,55	0,14
	III	5,12	0,20

PA: porcentaje de grupos acetilo, GS: grado de sustitución.

La acetilación de los almidones se confirmó mediante IR, comparando el almidón nativo con el modificado para los dos almidones evaluados, y presentó la aparición de una señal a los 1.748 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento $\text{C}=\text{O}$, debido a la introducción de un grupo carbonilo (resultados no mostrados).

Las pruebas realizadas a los almidones pretendieron evaluar si se presentan diferencias o no entre los almidones modificados y nativos y así poder evidenciar si existe alguna ventaja asociada al proceso de acetilación, así como alguna posible aplicación en caso de existir esta ventaja. Por esta razón, los resultados y la discusión que se presentan a continuación, involucran la comparación de los almidones nativos y modificados para cada uno de los casos. En primer lugar, se muestran los resultados de las caracterizaciones efectuadas a los almidones en dispersión y, posteriormente, las pruebas en el estado sólido.

En dispersión

Los resultados de los ensayos en dispersión muestran ventajas en términos del poder de hinchamiento y de la viscosidad, del almidón de millo modificado en comparación del almidón de maíz; este último con grandes aplicaciones en el campo farmacéutico y de alimentos [19].

Poder de hinchamiento

Los resultados de las pruebas de determinación del poder de hinchamiento (figura 2), evidencian una mayor capacidad para el almidón de millo en comparación del almidón de maíz, viéndose esta incrementada con la temperatura y con el aumento del GS. El nivel de hinchamiento (número de veces que incrementa su tamaño) fue mayor para los almidones acetilados de millo presentando valores cercanos a 25; para los almidones modificados de maíz, estos valores fueron siempre menores a 15.

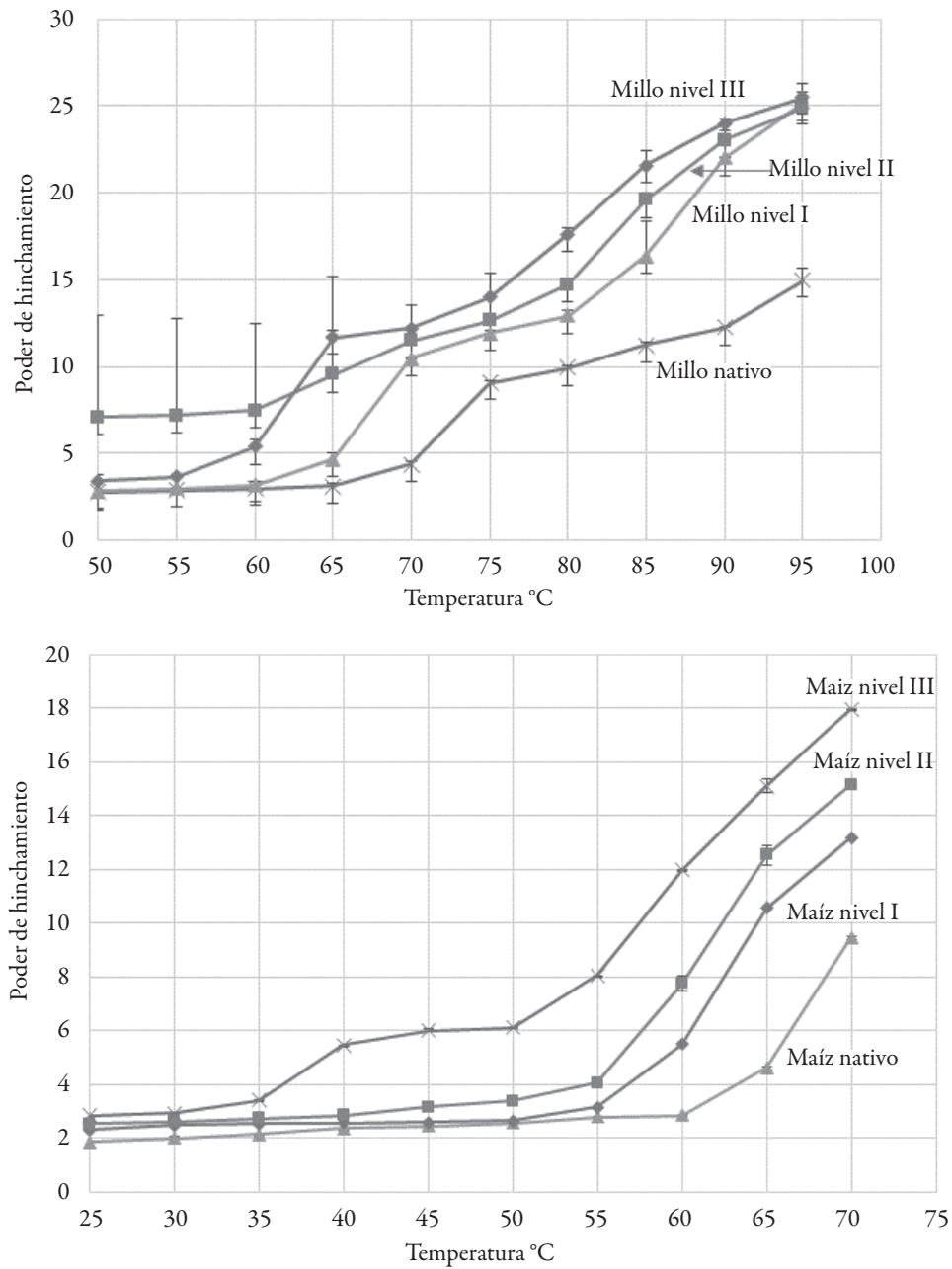


Figura 2. Poder de hinchamiento para los almidones de millo (nativo y modificados), a la izquierda, y maíz (nativo y modificados) como referencia, a la derecha.

De acuerdo con la literatura, el poder de hinchamiento se incrementa, por lo general en almidones acetilados [14, 20, 21]. Los cambios en los valores de hinchamiento observados en los almidones modificados, pueden atribuirse a la introducción de los grupos acetilo sustituyentes que retienen moléculas de agua mediante puentes de hidrógeno en los gránulos de almidón, facilitando su acceso a las áreas amorfas del mismo [12].

Perfil de viscosidad

Los perfiles comparativos de la viscosidad aparente en función de la velocidad de corte (figura 3), para los almidones nativos y modificados de millo y de maíz, ilustran una disminución de la misma en función del aumento de la velocidad de corte para todas las muestras, demostrando un comportamiento pseudoplástico. Los valores más altos de viscosidad, se dan para las dispersiones del almidón de millo, siendo más altos en la medida que aumenta el GS. Es así como el almidón modificado de millo nivel III, mostró los valores más altos de viscosidad, 40.000 cP, valor superior a lo encontrado para los almidones acetilados de maíz y a los no modificados de maíz, con valores cercanos a los 20.000 cP.

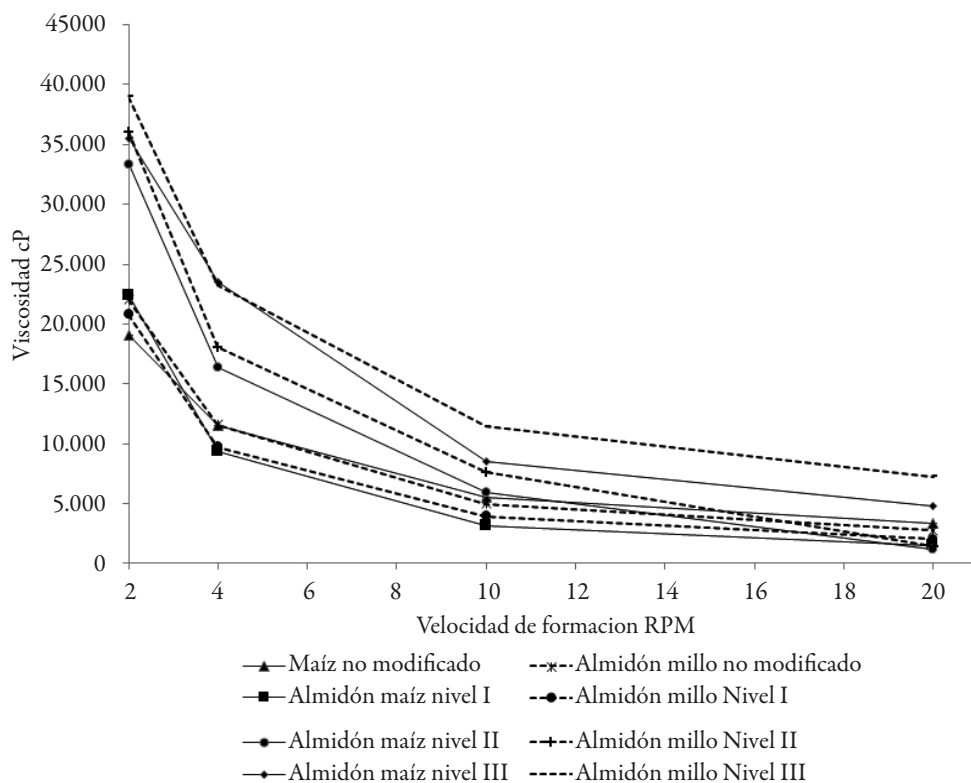


Figura 3. Viscosidad aparente para los almidones de maíz y millo en estudio.

La acetilación de los almidones de millo y maíz generaron un incremento de la viscosidad aparente, alcanzando mayores valores de viscosidad para el almidón de millo, como se comentó anteriormente. Un comportamiento similar es reportado por Bello-Pérez *et al.*, en estudios realizados al almidón de maíz y al almidón de plátano [11]. Algunos autores atribuyen este comportamiento al aumento de la capacidad de retener agua y al desarrollo de estructuras más organizadas, por la introducción de los grupos acetilo en la molécula de almidón [22, 23].

Temperatura de gelatinización

Los resultados de la determinación de la temperatura de gelatinización (figuras 4 y 5 y tabla 2), por calorimetría diferencial de barrido (DSC), muestran una disminución de esta temperatura con la acetilación. No hay una tendencia clara con los diferentes GS para ambos almidones. Es de resaltar que en el almidón de millo la disminución fue casi de 10 °C desde 71,41 °C, para el almidón no modificado, hasta 61,83 °C para el acetilado con mayor GS (nivel III). Para el almidón de maíz esta temperatura disminuyó en aproximadamente ocho grados.

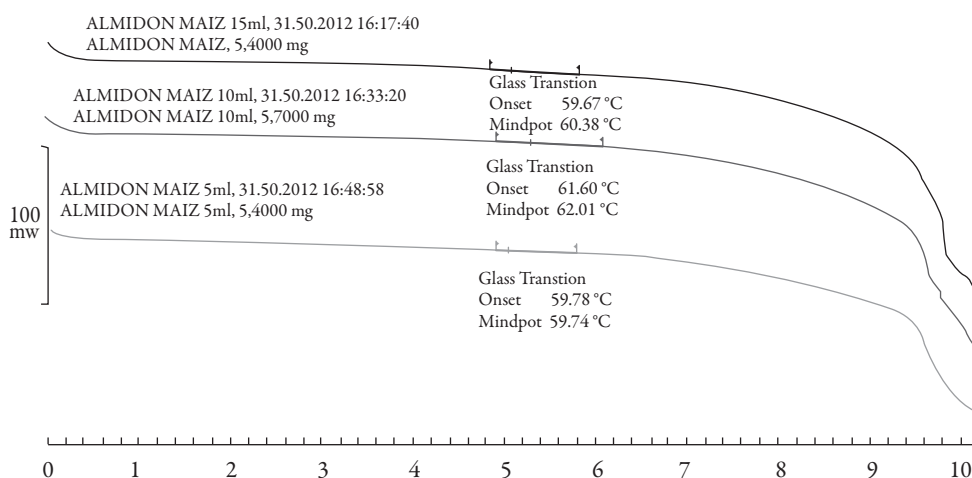


Figura 4. Termograma de los almidones de maíz acetilados. Almidón de maíz 5 mL: nivel I; almidón de maíz 10 mL: nivel II; almidón de maíz 15 mL: nivel III.

La disminución de la temperatura de gelatinización, observada en los almidones modificados, podría atribuirse al daño sufrido por el gránulo, que involucra la interrupción de las dobles hélices en las regiones amorfas debida a los grupos acetilo ahora presentes, lo que a su vez disminuye las tensiones de los grupos hidroxilos existentes en los almidones sin modificar. Por otra parte, la voluminosidad de los grupos acetilos le da más flexibilidad al biopolímero, lo que contribuye también a la reducción de esta temperatura, en los almidones acetilados [24].

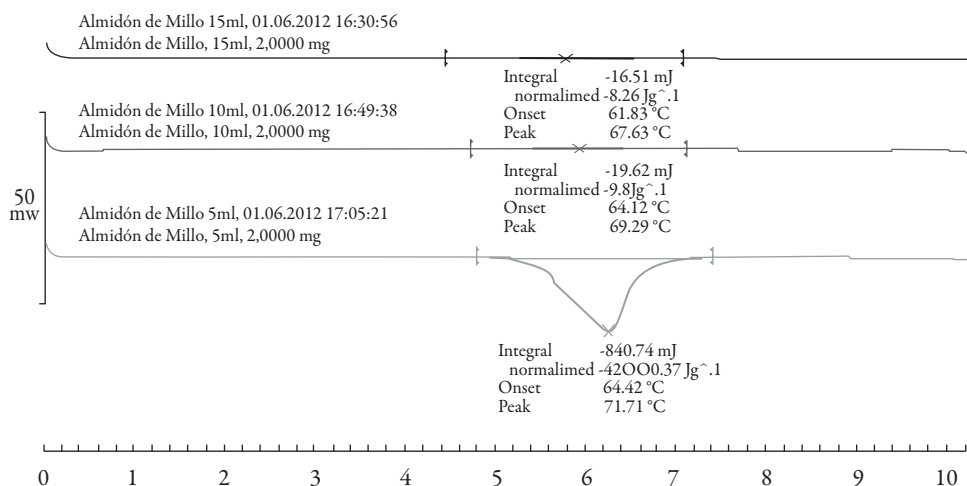


Figura 5. Termograma de los almidones de millo acetilados. Almidón de millo 5 mL: nivel I; almidón de millo 10 mL: nivel II; almidón de millo 15 mL: nivel III.

Tabla 2. Temperatura de gelatinización evaluada para los almidones nativos y modificados de maíz y millo.

Tipo de almidón	Nivel de acetilación	Temperatura de gelatinización (°C)
Almidón de maíz	No modificado	67,34
	I	59,78
	II	61,60
	III	59,67
Almidón de millo	No modificado	71,41
	I	64,42
	II	64,12
	III	61,83

Sinéresis

El porcentaje de agua liberada para las muestras de almidón en estudio (figura 6), como resultado del ensayo de estabilidad al congelamiento-descongelamiento se hace menor en los almidones de maíz modificados en comparación con los de millo, mostrándose más estables; mientras que para los almidones modificados de millo la acetilación solo mejoró ligeramente este comportamiento. Este aumento de la estabilidad es notorio para el almidón de maíz posiblemente atribuido al mayor GS alcanzado, disminuyendo el porcentaje de agua liberada del 44,7% para el almidón de maíz nativo hasta 27,94%

para el almidón de maíz con el GS más alto. Para el almidón de millo, la reducción del agua liberada fue del 0,5%, comparando el almidón nativo con el de mayor GS.

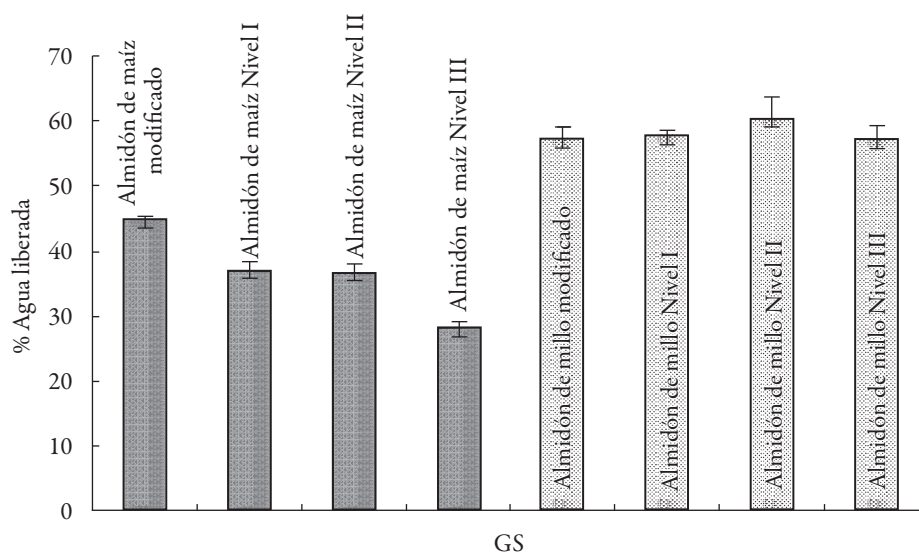


Figura 6. Estabilidad al congelamiento-deshielo del almidón de maíz y el de millo (sinéresis): porcentaje de agua liberada en función del grado de sustitución (GS).

La estabilidad al congelamiento-descongelamiento se mejora ligeramente en el almidón modificado de millo, tal vez debido a la introducción de los grupos acetilos que aumentan la capacidad de retención de agua y que se vio claramente evidenciada para el almidón de maíz, como se explicó antes [20-21, 25].

En el estado sólido

Los resultados de la mayoría de las pruebas en el estado sólido no difieren mucho entre el almidón nativo y el acetilado, para el caso del almidón de millo.

Sorción

La determinación de las isotermas de sorción empleando el equipo de Enslin (figura 7), evidencia que para los almidones no modificados se observa una velocidad constante de sorción, menor a la de los acetilados. Los almidones de millo, nativo y acetilados, captaron mayor volumen de agua que los almidones de maíz, a pesar de su menor GS.

Este aumento en la capacidad de sorción, debida a la acetilación, se favorece seguramente por la inclusión de los grupos acetilos que facilitan la incorporación de moléculas de agua en el almidón, por la formación de puentes de hidrógeno [4, 23].

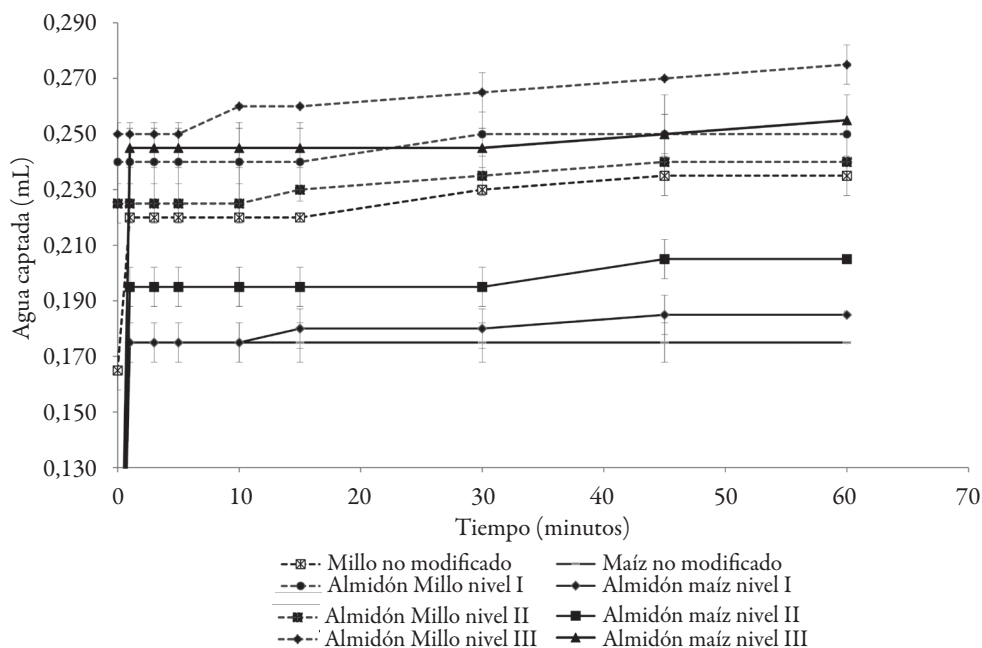


Figura 7. Isotermas de sorción del almidón de maíz y el de millo, expresada como el volumen captado en función del tiempo.

Difracción de rayos X

La evaluación de difracción de rayos X (DRX) (figura 8) evidencia, de manera cualitativa, una disminución de la intensidad de todas las señales a medida que se incrementa el GS; sin embargo, los ángulos a los que se presentan estas señales no se modificaron con estas variaciones.

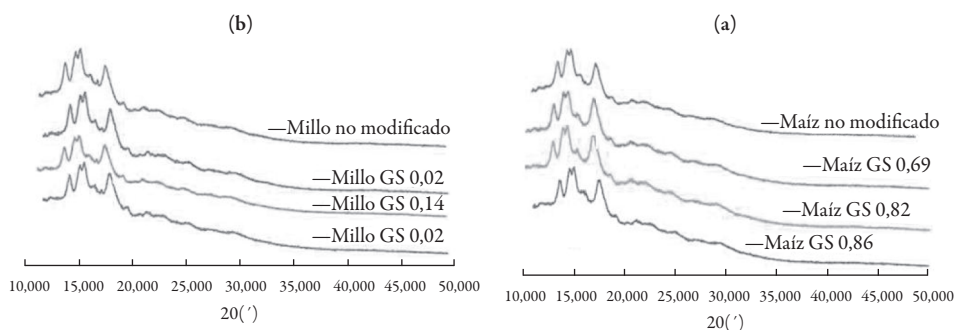


Figura 8. Perfil cristalográfico de los almidones de maíz (a) y millo (b) en estudio mediante DRX.

Los difractogramas muestran que la reacción de acetilación aparentemente produce daños pequeños en la estructura cristalina de los almidones modificados de millo; resultados similares se encontraron para las muestras de almidón de maíz acetilado [25, 26].

Morfología

Las fotografías obtenidas por microscopia electrónica de barrido para los almidones nativo y acetilado de millo y maíz nivel III (figuras 9 y 10), permitieron evidenciar su forma poligonal irregular, con una superficie rugosa para el caso del almidón de millo. Para el almidón de maíz se observó una superficie lisa y tamaño uniforme, posiblemente debido al origen industrial de las muestras analizadas. Los almidones modificados se caracterizaron por un mayor estado de agregación y ruptura en la estructura del gránulo, similar a lo encontrado por otros autores [25].

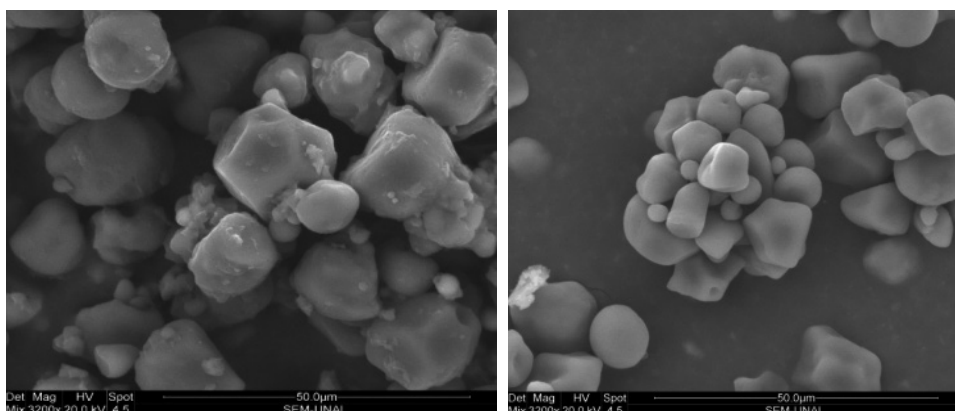


Figura 9. Microfotografías de los almidones de millo (izquierda) y de maíz (derecha) no modificados (3200X), por SEM.

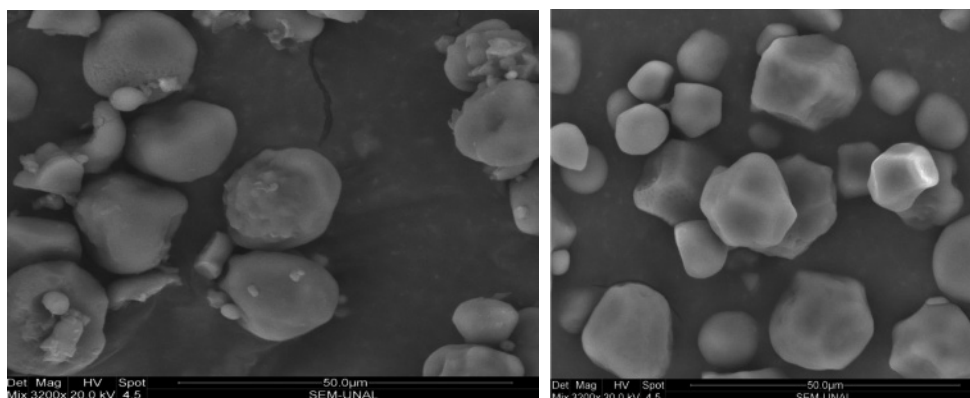


Figura 10. Microfotografías de los almidones de millo (izquierda) y de maíz (derecha) modificados a nivel III (3200X), por SEM.

Los gránulos de almidón de maíz aparentemente no fueron erosionados por el proceso de acetilación, debido probablemente a su pequeño tamaño de gránulo [16]. Van Hung y Morita, en un estudio del efecto del tamaño del gránulo en almidones acetilados, mostraron que cuando el tamaño del gránulo es mayor, sufren mayor daño durante el proceso de modificación química [27], lo que explicaría la presencia de gránulos más amorfos y con imperfecciones en su superficie, para el caso del almidón de millo acetilado.

Tamaño de partícula

En cuanto al tamaño de partícula (figura 11), se observa una disminución para los almidones en estudio, en la medida que aumenta el GS, tanto para el almidón de maíz como para el de millo, siendo este último el de mayor tamaño. El almidón de maíz nativo presenta un tamaño de partícula menor a 30,664 μm (para el 90% de las partículas), mientras el de millo tiene un tamaño menor a 90,778 μm (para el 90% de las partículas). El almidón de millo disminuyó significativamente su tamaño de partícula con la acetilación, el 90% de las partículas que tuvieron un tamaño menor a 51,1 μm cuando se llega al mayor GS, de acuerdo con los reportes generados por el equipo Mastersizer®.

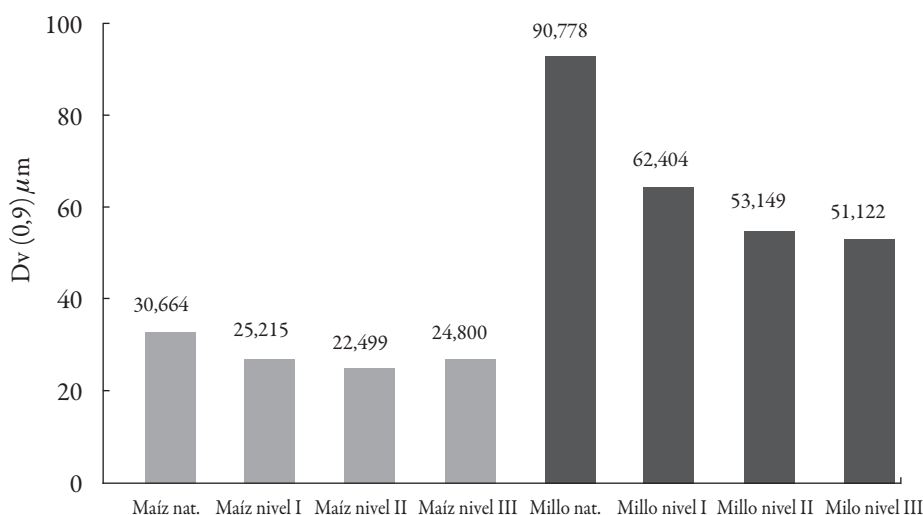


Figura 11. Tamaño de partícula de los almidones de maíz y millo en función del grado de sustitución. Nat: nativo; Nivel I: grado de sustitución I; Nivel II: grado de sustitución II; Nivel III: grado de sustitución III.

La diferencia en el tamaño de partícula de los dos almidones está asociada con su origen [12]. La disminución en el tamaño de partícula con el aumento en el GS, puede deberse a la reacción química, que ocasiona un daño en los gránulos de mayor tamaño, como ha sido reportado en la literatura [25].

Densidad aparente, densidad apisonada y propiedades relacionadas

La densidad apisonada (figura 12) presentó un aumento respecto a la densidad aparente, para los dos almidones, pero la tendencia no fue muy clara al aumentar el GS. Los almidones de millo en estudio presentaron mayor voluminosidad aparente con valores entre 2,76 y 3,22, su voluminosidad apisonada se encontró entre 1,40 y 1,57; los almidones de maíz presentaron menor voluminosidad aparente (1,75-2,01) y voluminosidad apisonada entre 1,32 y 1,44.

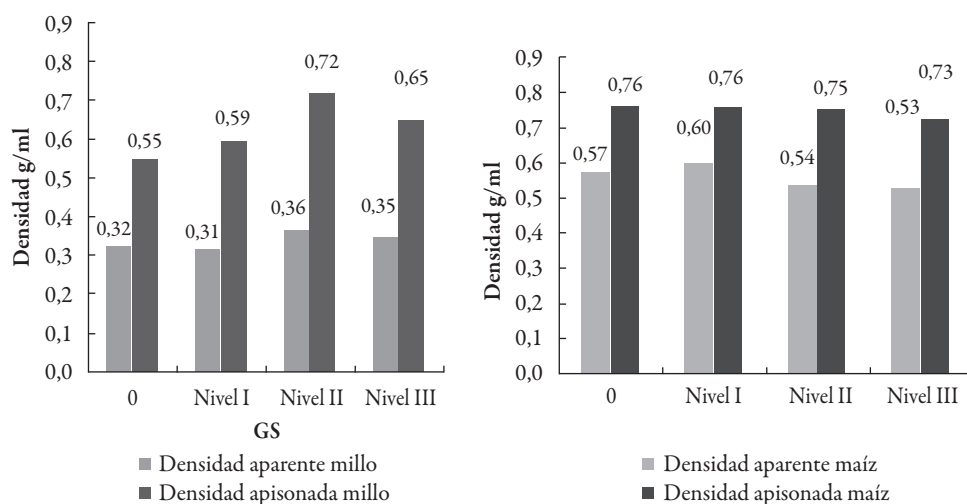


Figura 12. Densidad aparente y apisonada para los almidones de millo y maíz modificados y nativos en función del grado de sustitución (GS).

Los valores de índice de Hausner (tabla 3) de 1,26 a 1,97 clasifican a los almidones de maíz y millo, acetilados y no modificados como materiales de una fluidez pobre a extremadamente pobre; la acetilación de estos almidones no mostró un cambio favorable con respecto a este índice. Los valores de índice de Carr (tabla 3) sugieren una compresibilidad extremadamente pobre para el almidón de millo, 41-47 y pobre para el almidón de maíz con valores de 21-28.

El leve incremento observado en la densidad apisonada con el aumento en el grado de sustitución para el almidón de millo, podría atribuirse a la disminución del tamaño del gránulo explicado previamente y, por consiguiente, a su mejor empaquetamiento [12]. El aumento del GS no permitió mejoras significativas en las características de fluidez, compresibilidad o voluminosidad de los almidones de millo y maíz acetilados y no modificados. Rodríguez *et al.* encontraron resultados similares para el almidón de arracacha no modificado [15].

Tabla 3. Índices de Hausner y de Carr para los almidones nativos y modificados de maíz y millo.

Tipo de almidón	Nivel de acetilación	Índice de Hausner	Índice de Carr
Almidón de maíz	No modificado	1,33	24,82
	I	1,27	21,06
	II	1,40	28,30
	III	1,38	26,67
Almidón de millo	No modificado	1,71	41,34
	I	1,87	46,30
	II	1,97	49,13
	III	1,90	47,41

Compresión

El comportamiento bajo compresión no fue bueno, se caracterizó porque los almidones analizados presentaron adherencia a la matriz y dificultad en la expulsión. Las tabletas elaboradas y sometidas a observación por dos días, se mostraron inestables, liberando polvo y presentando grietas. El test de desintegración no mostró modificación en el tiempo entre las que se elaboraron con el almidón nativo y el acetilado, en todos los casos los tiempos de desintegración fueron menores a 1 minuto.

Teniendo en cuenta que los tiempos de desintegración entre los almidones nativos de millo y maíz fueron similares, se evidencia la capacidad del almidón de millo para emplearse como agente desintegrante, lo que concuerda con un estudio realizado en el que se emplea cloroquina como fármaco y el almidón de millo nativo como desintegrante [4].

De los resultados conseguidos se observan diferencias con la literatura científica, atribuidas, entre otras, a las fuentes del almidón de millo que no siempre son las mismas, incluso se han trabajado con otras especies [25, 28] o la misma pero provenientes de sitios diferentes [4].

CONCLUSIONES

La acetilación realizada al almidón de millo, produjo mejoras en sus propiedades en dispersión como su poder de hinchamiento, perfil de viscosidad y disminución de su temperatura de gelatinización y, en menor grado, una disminución de la sinéresis, lo que plantearía posibles aplicaciones de este almidón en la elaboración de geles más

estables y fáciles de obtener, que los que se consiguen con el almidón nativo ya sea en el campo farmacéutico o en el de alimentos.

Los resultados no permitieron evidenciar mejoras en propiedades como la voluminosidad, la fluidez y la compresibilidad; por tanto, no es adecuado para emplearse como diluyente de compresión directa. Sin embargo, su buen comportamiento en la sorción de agua (mejor que el del almidón de maíz) y bajos tiempos de desintegración como almidón nativo, confirman que pudiera emplearse como desintegrante en la elaboración de formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata, de manera similar a lo reportado por otros autores [4].

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento por la financiación recibida de la División de Investigación y Extensión de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, para llevar a cabo este proyecto (Código Proyecto: 12205). Además, el apoyo recibido por Laboratorios Procaps S.A.S. al permitirnos usar algunas de sus instalaciones y equipos.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. L.A. Bello, E. Agama-Acevedo, En "Starch-based materials in food packaging. Processing, characterization and applications". Ed. por M.A. Villa, S.E. Barbosa, M.A. García, L.A. Castillo, O. López, Elsevier, London, 2017, pp. 1-18.
2. C.G. Biliaderis, The structure and interaction of the starch with the food constituents, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **69**, 60 (1991).
3. N. Masina, Y.E. Choonara, P. Kumar, L.C. du Toit, M. Govender, S. Indermun, V. Pillay, A review of the chemical modification techniques of starch, *Carbohydr. Polym.*, **157**, 1226 (2017).
4. O.A. Odeku, C.O Alabi, Evaluation of native and modified forms of *Pennisetum glaucum* (millet) starch as disintegrant in chloroquine tablet formulations, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **17**(2), 155 (2007).

5. A.K. Jukanti, C.L. Laxmipathi, K.N. Rai, V.K. Manga, R.K. Bhatt, Crops that feed the world 11. Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* L.): An important source of food security, nutrition and health in the arid and semi-arid tropics, *Food Sec.*, **8**(2), 307 (2016).
6. F. Zhu, Structure, physicochemical properties and uses of millet starch, *Food Res. Int.*, **64**, 200 (2014).
7. I.A. Wolff, D.W. Olds, G.E. Hilbert, The acylation of corn starch, amylose and amylopectin, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**(1), 346 (1951).
8. L. Mirmoghtadaie, M. Kadivar, M. Shahedi, Effects of cross-linking and acetylation on oat starch properties, *Food Chem.*, **116**(3), 709 (2009).
9. L. Genung, R. Mallatt, Analysis of cellulose derivatives: Determination of total combined acyl in cellulose organic esters, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **13**(6), 369 (1941).
10. M.L Tsai, C.F Li, C.Y Lii, Effects of granular structures on the pasting behaviours of starches, *Cereal Chem.*, **74**(6), 750 (1997).
11. L.A. Bello-Pérez, S.M. Contreras-Ramos, R. Romero-Manilla, J. Solorza-Feria, A. Jiménez-Aparicio, Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano *Musa paradisiaca* L. (var. macho), *Agrociencia*, **36**(2), 169 (2002).
12. N.S. Sodhi, N. Singh, Characteristics of acetylated starches prepared using starches separated from different rice cultivars, *J. Food Eng.*, **70**, 117 (2005).
13. H. Nogami, T. Nagai, E. Fukuoka, T. Sonobe, Disintegration of the aspirin tablets containing potato starch and microcrystalline cellulose in various concentrations, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1450 (1969).
14. G. Ayala, I.C. Freitas, R.L. Vinicius, A.M. Quinta-Barbos, P.J. Sobral, Physicochemical, morphological, and functional properties of flour and starch from peach palm (*Bactris gasipaes* K.) fruit, *Starch/Stärke*, **67**, 163 (2015).
15. D. Rodríguez, M. Espitia, Y. Caicedo, Y. Córdoba, Y. Baena, C. Mora, Caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas y farmacotécnicas del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **34**(2), 140 (2005).
16. L. Kaur, J. Singh, O.J. McCarthy, H. Singh, Physico-chemical, rheological and structural properties of fractionated potato starches, *J. Food Eng.*, **82**, 383 (2007).
17. USP 39-NF 34, "The United States pharmacopeia", 4th edition, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2016.

18. L. Kaplan, E. Wolff, Compression characteristics in tableting, *Drug and Cosmetic Industry*, **88**, 594 (1961).
19. C. Chung-Wai, D. Solarek, en "Starch: Chemistry and technology", 3th edition, Elsevier, 2009, p. 629.
20. A.B. Das, G. Singh, S. Singh, C.S. Riar, Effect of acetylation and dual modification on physico-chemical, rheological and morphological characteristics of sweet potato (*Ipomoea batatas*) starch. *Carbohydr. Polym.*, **80**(3), 72 (2010).
21. S. Garg, A.K. Jana, Characterization and evaluation of acylated starch with different acyl groups and degrees of substitution, *Carbohydr. Polym.*, **83**, 1623 (2011).
22. O. López, N. Zaritzky, M. García, Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity, *J. Food Eng.*, **100**, 160 (2010).
23. W. Berski, A. Ptasek, P. Ptasek, R. Ziobro, G. Kowalski, M. Grzesik, B. Achremowicz, Pasting and rheological properties of oat starch and its derivatives, *Carbohydr. Polym.*, **83**(2), 665 (2011).
24. C.I.K. Diop, H.L. Li, B.J. Xie, J. Shi, Effects of acetic acid/acetic anhydride ratios on the properties of corn starch acetates, *Food Chem.*, **126**(4), 1662 (2011).
25. L. Jeng-Yune, Y. An-I, Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches, *J. Food Eng.*, **50**(3), 141 (2001).
26. H. Chi, K. Xu, X. Wu, Q. Chen, D. Xue, C. Song, W. Zhang, P. Wang, Effect of acetylation on the properties of corn starch, *Food Chem.*, **106**, 923 (2008).
27. P. Van Hung, N. Morita, Effect of granule sizes on physicochemical properties of cross-linked and acetylated wheat starches, *Starch/Stärke*, **57**, 413 (2005).
28. A. Afolabi, B.I. Olu-Owolabi, K.O. Adebawale, O.S. Lawal, C.O. Akintayo, Functional and tableting properties of acetylated and oxidised finger millet (*Eleusine coracana*) starch, *Starch/Stärke*, **64**, 326 (2012).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO:

A. Sulbarán, G.E. Matiz, Y. Baena, Acetilación del almidón de millo (*Pennisetum glaucum*) y evaluación de su aplicación como posible excipiente, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(2), 255-276 (2018).

Frequency of 14 genetic variants associated with breast cancer risk and treatment in a Colombian population

Yeimy Viviana Ariza Márquez^{1*}, Fabio Ancízar Aristizábal Gutiérrez², Alberto Gómez-Gutiérrez³, Piedad Elena Gómez⁴, María Consuelo Casas Gómez⁴, Ignacio Briceño Balcázar⁵

¹ Programa de doctorado en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia, *E-mail: yvarizam@unal.edu.co.

² Departamento de Farmacia e Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia.

³ Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

⁴ Instituto de Referencia Andino, Bogotá, Colombia.

⁵ Facultad de Medicina, Universidad de la Sabana, Chía, Colombia.

Received: April 21, 2017

Accepted: April 24, 2018

SUMMARY

Introduction: Genetic variations have been related to risk and treatment efficacy. Many polymorphisms in breast cancer are known to influence susceptibility, breast cancer risk and treatment outcome. Polymorphisms vary among populations; therefore, local studies are necessary.

Objective: To establish the frequency of polymorphisms associated to breast cancer risk and treatment pharmacogenomics in a group of Colombian individuals.

Methods: Data from microarray profiles including gene polymorphisms associated with breast cancer treatment were retrospectively collected (Pathway Genomics®). The frequency of marker CYP2D6 rs3892097 and a breast cancer panel (CAS8 rs1045485, CHEK21100delC, ESR1 rs2046210, FGFR2 rs1219648, intergenic_2q35rs13387042, intergenic_8q24 rs13281615, MSRP30 rs10941679, TNRC9 rs3803662, AKAP9 rs6964587, LSP1 rs3817198, MAP3K1rs889312, PALBS1592 delT, ESR1 rs3020314) were studied.

Results: Microarray data from 68 men and 92 women were analyzed. All polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. Genotypic frequencies of CYP2D6 rs3892097 C/T, CAS8 rs1045485 G/C, and those of genes included in a breast cancer panel (CAS8 rs1045485, CHEK21100delC, FGFR2rs1219648, intergenic_2q35rs13387042, intergenic_8q24 rs13281615, MSRP30 rs10941679, TNRC9 rs3803662, LSP1 rs3817198, MAP3K1rs889312, PALBS1592 del T, ESR1rs3020314) did not significantly differ from previously published data. ESR1 rs2046210, with allele frequencies of C=0.04 and T=0.02, and AKAP9 rs6964587, with a frequency of A=0.005, were determined as rare.

Conclusions: The population studied was not significantly different in allele distribution from previously reported data at HapMap. Genotypes in Colombian population are similar to other previously studied groups of healthy subjects. Extended use of genotyping pharmacogenetic polymorphisms will prevent toxicity and adverse effects in tamoxifen treatment (for example in CYP2D6 rs3892097). Therefore, therapeutic alternatives should be evaluated based on individual pharmacogenetic studies.

Key words: Colombia; pharmacogenomics; breast Cancer.

RESUMEN

Frecuencia de 14 variantes genéticas asociadas con el riesgo y el tratamiento del cáncer de mama en una población colombiana

Introducción: las variaciones genéticas se han relacionado con el riesgo y la eficacia del tratamiento. Es sabido que muchos polimorfismos en cáncer de mama influyen en la susceptibilidad, el riesgo de cáncer y el resultado del tratamiento. Los polimorfismos varían entre las poblaciones, y por tanto, es necesario realizar estudios locales.

Objetivo: establecer la frecuencia de polimorfismos asociados al riesgo de cáncer de mama y la farmacogenómica del tratamiento en un grupo de individuos colombianos.

Métodos: los datos de los perfiles de microarreglos, incluidos los polimorfismos genéticos asociados con el tratamiento del cáncer de mama, se obtuvieron de forma retrospectiva (Pathway Genomics®). Se estudiaron la frecuencia del marcador CYP2D6 rs3892097 y un panel de cáncer de mama (CAS8 rs1045485, CHEK21100delC, ESR1 rs2046210, FGFR2rs1219648, intergenic_2q35rs13387042, intergenic_8q24 rs13281615, MSRP30 rs10941679, TNRC9 rs3803662, AKAP9 rs6964587, LSP1 rs3817198, MAP3K1rs889312, PALBS1592 delT, ESR1 rs3020314).

Resultados: se analizaron los datos de microarreglos de 68 hombres y 92 mujeres. Todos los polimorfismos siguieron el equilibrio Hardy-Weinberg. Las frecuencias fenotípicas de CYP2D6 rs3892097 C/T, CAS8 rs1045485 G/C, y aquellas de los genes incluidos en un panel de cáncer de mama (CAS8 rs1045485, CHEK21100delC, FGFR2rs1219648, intergenic_2q35rs13387042, intergenic_8q24 rs13281615, MSRP30 rs10941679, TNRC9 rs3803662, LSP1 rs3817198, MAP3K1rs889312, PALBS1592 del T, ESR1rs3020314) no difirieron significativamente de los datos publicados previamente. ESR1 rs2046210, con frecuencias alélicas de C = 0,04 y T = 0,02, y AKAP9 rs6964587, con una frecuencia de A = 0,005, se determinaron como raras.

Palabras clave: Colombia; farmacogenómica; cáncer de mama.

INTRODUCTION

Advances in technology have made multigene testing, or “panel testing”, a practical option when looking for genetic variants that may be associated with a risk of breast cancer and treatment outcome. Use of pharmacogenomics will optimize treatment and lower health costs. In this context, it is necessary to study disease associations and pharmacogenetic polymorphisms in populations to optimize disease treatment. In the case of breast cancer, tamoxifen metabolism related polymorphisms are associated to treatment, but their frequency is poorly known in Colombian population.

Using different platforms to process and analyze samples can simultaneously identify genetic variants associated with susceptibility, clinical outcomes and drug response. For example, the spectrum of the frequency of the *MTHFR* gene polymorphism C677T in a group of healthy Colombian individuals was previously determined to evaluate the genetic background in relation to disease susceptibility and pharmacogenetic applications; the results for the C/C and C/T genotypes in a Colombian population were similar to other previously studied groups of healthy subjects. Subjects from Colombian populations might be at risk of developing diseases associated with *MTHFR* polymorphisms and might present toxicity and adverse effects if treated with MTX, which suggests the need to evaluate therapeutic alternatives based on individual pharmacogenetic studies [1].

In the case of breast cancer, the response to several hormone therapeutics, such as tamoxifen are mediated by the action of CYP2D6, which is highly polymorphic, and genotypes has been identified allowing classifying patients as ultra-rapid, normal and poor metabolizers.

Genetic variants in certain genes have been associated with early cancer risk [2], risk of developing cancer [3] and susceptibility to cancer [4]. In this way, CYP2D6*4 variant (rs3892097) is associated with response to tamoxifen, since patients carrying a T allele will present slow metabolism of this drug and would therefore need a dose adjustment or an alternative therapy [5]. In the case of CAS8 rs1045485, its C allele is associated with a lower risk of breast cancer [6,7]. On the other hand, ESR1 rs2046210 has been associated with risk of developing breast and endometrial cancer in Chinese women [8-10], and variant C has been associated with ER-negative but not ER-positive breast cancer ($P > 0.05$). These findings provide further evidence for distinct etiological pathways associated with invasive ER-positive and ER-negative breast cancer in younger women and women of African ancestry [11]. FGFR2rs1219648 showed a similar association with the risk of developing breast cancer in Chinese [12] and Indian populations [13]. Polymorphism rs13387042-2q35(G/A), has been associated with breast cancer risk only among postmenopausal women who never used hormone therapy [14]. Furthermore, the GG genotype of SNP rs13281615 plays a role in breast cancer through PVT1 expression during oncogenesis, and "protective" mutations could occur [15]. MSRP30 rs10941679 was significantly associated with BCIS (Breast cancer in situ) risk [16]. As for TNRC9 rs3803662, allele GG increased the risk of breast cancer in codominant inheritance (OR=2.19, 95% CI:1.19-4.02), and recessive genetic models (OR=2.06, 95% CI: 1.15-3.70) [17]. Moreover, the variant rs6964587 was associated with increased breast edema due to radiotherapy after the following 5 years (Beta, 0.22; 95% confidence interval, 0.09-0.34; $P = 7 \times 10^{-4}$) [18] and increased to risk of breast cancer [19]. LSP1 rs3817198 has been associated with mammographic density in genome-wide studies [20]. Likewise, MAP3K1rs889312, has been associated with breast cancer risk in women of European ancestry [21] and ESR1rs3020314 showed stronger associations in ER-positive [22]. Finally, in AKAP9, the minor T allele of 7q21-rs6964587 was associated with breast cancer risk under a recessive model (OR 1.07, 95% CI 1.00 to 1.13, $p = 0.04$) [23].

Knowledge of Colombian disease associated polymorphism frequencies will allow to establish National Health policies to improve health and treatment outcome.

METHODS

Population

A retrospective cross-sectional study in 160 healthy Colombian individuals over 18 years was conducted using molecular genetic profiling, age ranges between 18 and 74 years with a mean of 40.07 years. DNA samples were collected from saliva samples in Instituto de

Referencia Andino, as well as all corresponding applications from medical orders and/or individuals received between the years 2012 and 2014. All individuals signed an informed consent.

The Healthy Woman DNA Insight™ panel from Pathway Genomics® evaluates panel of breast cancer (CAS8 rs1045485, CHEK21100delC, ESR1 rs2046210, FGFR2rs1219648, intergenic_2q35rs13387042, intergenic_8q24 rs13281615, MSRP30 rs10941679, TNRC9 rs3803662, AKAP9 rs6964587, LSP1 rs3817198, MAP3K1rs889312, PALBS1592 delT, ESR1rs3020314). The pharmacogenetic polymorphism panel from Pathway Genomics® in *Medication DNA Insight™ genetic* test evaluates 15 metabolism associations for drug metabolism, including Tamoxifen (CYP2D6*4), in addition to Abacavir® hypersensitivity, aminoglycoside-induced ototoxicity, response to beta blockers, carbamazepine hypersensitivity, clopidogrel metabolism, estrogen supplementation, alpha interferon, metoprolol metabolism, metabolism and hypersensitivity to phenytoin, proton-pump inhibitor, simvastatin induced myopathy, metabolism of voriconazole and warfarin.

DNA microarrays were used to measure expression levels of probes, corresponding to alleles in CAS8 rs1045485, CHEK21100delC, ESR1 rs2046210, FGFR2rs1219648, intergenic_2q35rs13387042, intergenic_8q24 rs13281615, MSRP30 rs10941679, TNRC9 rs3803662, AKAP9 rs6964587, LSP1 rs3817198, MAP3K1rs889312, PALBS1592 delT, ESR1rs3020314 genes. Each microarray position contains 10-12 picomoles of a specific DNA sequence under high stringency. Probe-target hybridization was detected and quantified by fluorophores attached to the probe.

The frequency of the polymorphism substitution in the genes markers was analyzed. Each participant was identified by a code used in a database, where the descriptive analysis for continuous variables such as age was performed with measures of central tendency and Shapiro-Wilk normality test. The description of categorical variables (origin, sex, genotype and allele) was performed by frequency analysis. Given the variable nature of the study association levels, they were evaluated by a Chi square test (X^2) with a confidence level of 95%. In addition, Hardy-Weinberg equilibrium was tested. Data base designed in Access includes the following variables that were Collected: Code anonymity of each individual, age, gender, date of birth, maternal ancestry, paternal ancestry, nationality, CYP2D6 rs3892097, panel for breast cancer (CAS8 rs1045485, CHEK21100delC, ESR1 rs2046210, FGFR2rs1219648, intergenic_2q35rs13387042, intergenic_8q24 rs13281615, MSRP30 rs10941679, TNRC9 rs3803662, AKAP9 rs6964587, LSP1 rs3817198, MAP3K1rs889312, PALBS1592 delT, ESR1rs3020314).

Statistical Methods

Available results were tabulated to perform the respective calculation of frequencies of each polymorphism and Hardy-Weinberg equilibrium was calculated using the online Curt Lab - HW calculator, and then a Genpop software was used in order to define genetic frequencies. Later on, contingency tables were established with a double entry and Chi squared distribution calculated. Results were transferred to the SPSS statistical program for Windows V20. They were not stratified by ethnic group or socioeconomic levels. Available frequencies were collected in HapMap Genome Browser release #28 (Phases 1, 2 and 3 - merged genotypes and frequencies) for the general population and also for the Colombian population for each of the variants tested in this review.

Ethical considerations

This study was approved by the Ethics Committee of Universidad Nacional de Colombia.

RESULTS

No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium is present; therefore, the population included in this study showed no significant migration, subgroup stratification, inbreeding or selection processes. Additionally, by contrasting data reported in HapMap for general population, Colombians of the present study have no significant differences with the sample of Colombian population reported in HapMap.

After evaluating each particular polymorphism, CYP2D6*4 rs3892097, CAS8 rs1045485, MSRP30 rs10941679, LSP1 rs3817198 and MAP3K1 rs889312, data found in the present study are similar to data report for general and Colombian population previously evaluated in HapMap. Allele Frequency Comparison between Present Study and HapMap is shown in Table 1.

Polymorphisms FGFR2 rs1219648, intergenic 2q35-rs13387042, intergenic 8q24-rs13281615, TNRC9 rs3803662 and ESR1 rs3020314, showed higher frequencies than those reported previously for the Colombian population in HapMap, and has greater similarity to those reported for the global population.

In addition, we identified in ESR1 rs2046210 variants C and G have frequencies of 0.04 and 0.02, respectively; similarly, AKAP9 rs6964587 allele A was found in a frequency of 0.005. The presence of these variants had not been previously reported in the Colombian population or the HapMap database.

Table 1. Allele frequency comparison between a Colombian population in the present study and HapMap database.

Gen -SNP	Ref SNP Alleles	MAF	Ancestral Allele	Population genetics ALL	1000 Genomes Browser Allele frequencies CLM	Alleles frequencies IRA	HW
CYP2D6*4 rs3892097	C/T	T: 0.09	C	C = 0.91 T = 0.09	C = 0.8351 T = 0.1649	C = 0.903 T = 0.087	X ² = 2,71 X ² test P value = 0,099
CAS8 rs1045485	C/G	C: 0.05	G	G = 0.95 C = 0.05	G = 0.9149 C = 0.0851	G = 0.94 C = 0.06	X ² = 0,401 X ² test P value = 0,526
CHEK21100delC	The protein-truncating						
ESR1 rs2046210	G/A	A: 0.41	A	G = 0.41 A = 0.59	G = 0.7340 A = 0.2660	G = 0.74 A = 0.20 C = 0.04 T = 0.02	X ² = 3,082 X ² test P value = 0,079
FGFR2 rs1219648	A/G	G: 0.41	A	A = 0.59 G = 0.41	A = 0.6436 G = 0.3564	A = 0.64 G = 0.36	X ² = 0,149 X ² test P value = 0,699
intergenic_2q35 rs13387042	A/G	A: 0.47	G	A = 0.47 G = 0.53	A = 0.4149 G = 0.5851	A = 0.42 G = 0.58	X ² = 0,169 X ² test P value = 0,68
intergenic_8q24 rs13281615	A/G	G: 0.49	A	A = 0.51 G = 0.49	A = 0.4681 G = 0.5319	A = 0.46 G = 0.54	X ² = 0,865 X ² test P value = 0,352

(Continue)

Table 1. Allele frequency comparison between a Colombian population in the present study and HapMap database (*continuation*).

Gen -SNP	Ref SNP Alleles	MAF	Ancestral Allele	Population genetics ALL	1000 Genomes Browser Allele frequencies CLM	Alleles frequencies IRA	HW
MSRP30 rs10941679	A/G (FWD)	G: 0.32	A	A= 0.68 G= 0.32	A=0.7021 G=0.2979	A=0.65 G=0.35	X2 =0,048 X2 test P value = 0,825
TNRC9 rs3803662	A/G	A: 0.44	G	A= 0.44 G= 0.56	A=0.4149 G=0.5851	A=0.39 G=0.61	X2 =0,782 X2 test P value = 0,376
AKAP9 rs6964587	G/T (FWD)	T: 0.37	T	G= 0.63 T= 0.37	G=0.5585 T=0.4415	G=0.580 T=0.415 A=0.005	X2 = 0,0059 X2 test P value = 0,938
LSP1 rs3817198	C/T (FWD)	C: 0.22	T	T= 0.78 C= 0.22	T=0.7713 C=0.2287	T=0.75 C=0.25	X2 = 1,865 X2 test P value = 0,172
MAP3K1 rs889312	A/C (FWD)	C: 0.39	A	A= 0.61 C= 0.39	A=0.5638 C=0.4362	A=0.59 C=0.41	X2 =0,085 X2 test P value = 0,771
ESR1 rs3020314	C/T (FWD)	T: 0.38	C	C= 0.62 T= 0.38	C=0.5426 T=0.4574	C=0.45 T=0.55	X2 = 0,552 X2 test P value = 0,458

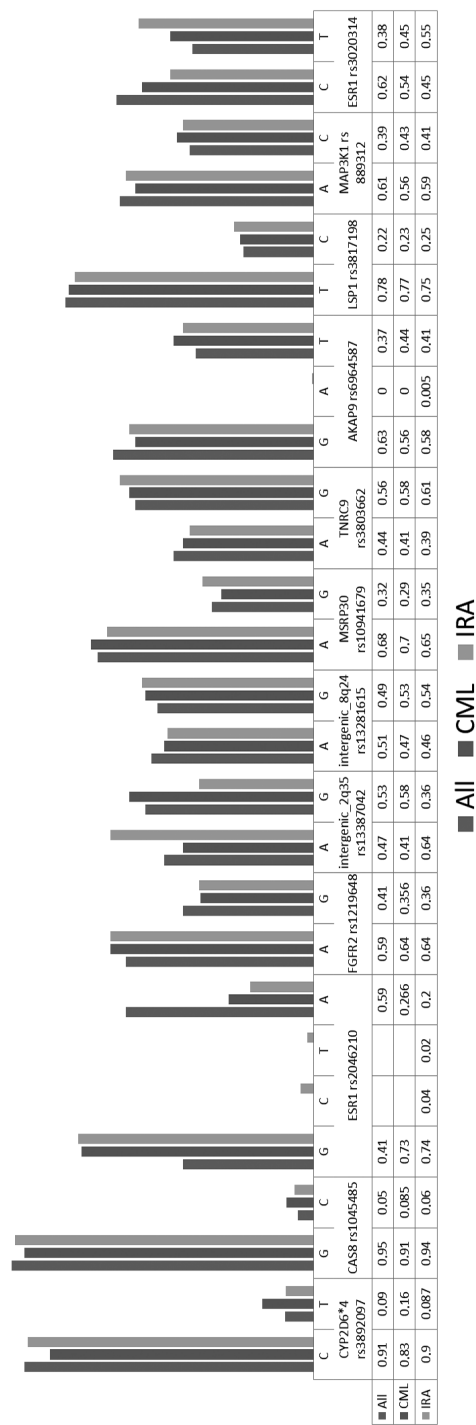


Figure 1. Bar chart for gene frequencies.

The graph shows the allele frequencies of the world population reported in HapMap in blue (All), the Colombian population in HapMap in red (CML) and the data from this study in green (IRA).

DISCUSSION

As we move from gene disease discovery into the application of genetic knowledge, allele frequency studies in populations become more important for the design, implementation of studies and for determining treatment according to personal polymorphisms. Studies in Colombian population are scarce, and the present study determined the allele frequencies of 14 polymorphisms, previously associated with breast cancer status. Allele frequencies were compared with dbSNP and other data sources in HapMap.

Allele frequencies for minor alleles relevant for Colombian population are here reported, although the number of individuals within the categories is small. Local differences in allele frequencies should be considered when designing association studies in the future. One weakness of our analysis is the lack of treatment follow-up due to the diversity of places where patients are treated.

The number of useful biomarkers for predicting drug response will rapidly increase for improving treatment and settle the basis for personalized medicine. Pharmacogenetic profiles will be useful for prevention programs, and personalized therapies will reduce health costs and ensure a more efficient health care.

CONCLUSION

The population studied was not significantly different in allele distribution with previously reported data from HapMap. Genotypes in Colombian population are similar to other previously studied groups of healthy subjects. The use of genotyping pharmacogenetic polymorphisms will prevent toxicity and adverse effects in tamoxifen treatment (for example in CYP2D6 rs3892097), and therapeutic alternatives should be evaluated based on individual pharmacogenetic studies.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. C. Romero-Sánchez, A. Gómez-Gutiérrez, P.E. Gómez, M.C. Casas-Gómez, I. Briceño, C677T (RS1801133) MTHFR gene polymorphism frequency in a colombian population, *Colombia Médica*, **46**(2), 75-79 (2015).

2. O. Fletcher, F. Dudbridge, Candidate gene-environment interactions in breast cancer, *BMC Medicine*, **12**, 195 (2014).
3. Y. Sun, C. Ye, X. Guo *et al.*, Evaluation of potential regulatory function of breast cancer risk locus at 6q25.1, *Carcinogenesis*, **37**(2), 163-168 (2016).
4. F. Cui, D. Wu, W. Wang, X. He, M. Wang, Variants of FGFR2 and their associations with breast cancer risk: a HUGE systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.*, **155**(2), 313-335 (2016).
5. E. Sirachainan, S. Jaruhathai, N. Trachu *et al.*, CYP2D6 polymorphisms influence the efficacy of adjuvant tamoxifen in Thai breast cancer patients, *Pharmgenomics Pers. Med.*, **5**, 149-153 (2012).
6. A. Cox, A.M. Dunning, M. García-Closas *et al.*, A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk, *Nat. Genet.*, **39**(3), 352-358 (2007).
7. T.N. Sergentanis, K.P. Economopoulos, Association of two CASP8 polymorphisms with breast cancer risk: A meta-analysis, *Breast Cancer Res. Treat.*, **120**(1), 229-234 (2010).
8. W. Zheng, J. Long, Y.T. Gao *et al.*, Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1, *Nat. Genet.*, **41**(3), 324-328 (2009).
9. Q. Cai, W. Wen, S. Qu *et al.*, Replication and functional genomic analyses of the breast cancer susceptibility locus at 6q25.1 generalize its importance in women of chinese, Japanese, and European ancestry, *Cancer Res.*, **71**(4), 1344-1355 (2011).
10. G. Li, Y.B. Xiang, R. Courtney *et al.*, Association of a single nucleotide polymorphism at 6q25.1, rs2046210, with endometrial cancer risk among Chinese women. *Chin. J. Cancer*, **30**(2), 138-143 (2011).
11. M. García-Closas, F.J. Couch, S. Lindstrom *et al.*, Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci, *Nat. Genet.*, **45**(4), 392-398 (2013).
12. H. Liang, X. Yang, L. Chen *et al.*, Heterogeneity of breast cancer associations with common genetic variants in FGFR2 according to the intrinsic subtypes in Southern Han Chinese women, *Biomed Res. Int.*, **2015**, 626948 (2015).
13. S. Siddiqui, S. Chattopadhyay, M.S. Akhtar *et al.*, A study on genetic variants of Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) and the risk of breast cancer from North India, *PLoS One*, **9**(10), e110426 (2014).
14. L. Fejerman, M.C. Stern, E.M. John *et al.*, Interaction between common breast cancer susceptibility variants, genetic ancestry, and nongenetic risk factors in Hispanic women, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **24**(11), 1731-1738 (2015).

15. Z. Zhang, A. Zhu, B. Zhang *et al.*, Frequent mutation of rs13281615 and its association with PVT1 expression and cell proliferation in breast cancer, *J. Genet. Genomics*, **41**(4), 187-195 (2014).
16. D. Campa, M. Barndahl, M.M. Gaudet *et al.*, Genetic risk variants associated with in situ breast cancer, *Breast Cancer Res.*, **17**, 82 (2015).
17. Q. Chen, Y. He, C. Liu *et al.*, [Associations between TOX3 rs3803662 polymorphisms and immunological markers of breast cancer], *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **95**(34), 2783-2786 (2015).
18. L. Dorling, G.C. Barnett, K. Michailidou *et al.*, Patients with a high polygenic risk of breast cancer do not have an increased risk of radiotherapy toxicity, *Clin. Cancer Res.*, **22**(6), 1413-1420 (2016).
19. R.L. Milne, B. Burwinkel, K. Michailidou *et al.*, Common non-synonymous SNPs associated with breast cancer susceptibility: Findings from the Breast Cancer Association Consortium, *Hum. Mol. Genet.*, **23**(22), 6096-6111 (2014).
20. A. Rudolph, P.A. Fasching, S. Behrens *et al.*, A comprehensive evaluation of interaction between genetic variants and use of menopausal hormone therapy on mammographic density, *Breast Cancer Res.*, **17**, 110 (2015).
21. D.M. Glubb, M.J. Maranian, K. Michailidou *et al.*, Fine-scale mapping of the 5q11.2 breast cancer locus reveals at least three independent risk variants regulating MAP3K1, *Am. J. Hum. Genet.*, **96**(1), 5-20 (2015).
22. L. Quan, C.C. Hong, G. Zirpoli *et al.*, Variants of estrogen-related genes and breast cancer risk in European and African American women, *Endocr. Relat. Cancer*, **21**(6), 853-864 (2014).
23. R.L. Milne, J. Lorenzo-Bermejo, B. Burwinkel *et al.*, 7q21-rs6964587 and breast cancer risk: an extended case-control study by the Breast Cancer Association Consortium, *J. Med. Genet.*, **48**(10), 698-702 (2011).

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Y.V. Ariza-Márquez, F.A. Aristizábal-Gutiérrez, A. Gómez-Gutiérrez, P.E. Gómez, M.C. Casas-Gómez, I. Briceño-Balcázar, Frequency of 14 genetic variants associated with breast cancer risk and treatment in a Colombian population, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(2), 277-288 (2018).

Evaluación teórica del desempeño del electrodo, modificado por el oxihidróxido de cobalto (III) en la detección del ácido úrico

Volodymyr V. Tkach^{1,2*}, Yana G. Ivanushko¹, Svitlana M. Lukanova¹, Marta V. Kushnir¹,
Sílvia C. de Oliveira², Reza Ojani³, Olga V. Luganska⁴ y Petró I. Yagodynets¹

¹ Universidad Nacional de Chernivtsi, 58000, calle de Kotsyubyns'ky, 2, Chernivtsi, Ucrania.

*Correo electrónico: nightwatcher2401@gmail.com.

² Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Sen. Felinto. Müller, 1555, C/P. 549, 79074-460, Campo Grande, MS, Brasil.

³ Universidad de Mazandarán, 3^{er} km. Ruta de Fuerzas Aéreas, 47416-95447, Babolsar, República Islámica de Irán.

⁴ Universidad Nacional de Zaporizhzhya, Facultad de Biología, 69095, calle de Zhukovs'ky, 66, Zaporizhzhya, Ucrania.

Recibido para evaluación: 24 de noviembre de 2016

Aceptado para publicación: 27 de abril de 2018

RESUMEN

La posibilidad del empleo de oxihidróxido de cobalto como modificador del electrodo en la detección del ácido úrico se investigó desde el punto de vista teórico. Se sugiere el mecanismo del desempeño del compuesto inorgánico en el proceso, y el modelo, correspondiente al proceso, se analizó mediante la teoría de estabilidad lineal y análisis de bifurcaciones. Se concluye que el oxihidróxido de cobalto puede servir como un modificador eficiente, facilitando la oxidación del analito en medio neutro en el modo galvanostático. La inestabilidad monotónica para este caso no puede realizarse, y la oscilatoria es causada por el único factor.

Palabras clave: ácido úrico, sensores electroquímicos, electrodos químicamente modificados, oxihidróxido de cobalto (III), estado estacionario estable.

SUMMARY

Theoretical evaluation of the work of the electrode, modified by cobalt (III) oxyhydroxide, in the uric acid detection

The possibility of use of cobalt oxyhydroxide as an electrode modifier in the uric acid determination has been investigated from the theoretical point of view. The mechanism of the use of the inorganic compound in the process has been suggested, and the model, correspondent to the process, has been analyzed by means of linear stability theory and bifurcation analysis. It has been concluded that the cobalt oxyhydroxide may serve as an efficient modifier, making easier the analyte oxidation in neutral media in galvanostatic mode. The monotonic instability for this case isn't capable to realize, and the oscillatory behavior is caused by the unique factor.

Key words: Uric acid, electrochemical sensors, chemically modified electrodes, cobalt (III) oxyhydroxide, stable steady-state.

INTRODUCCIÓN

El uso de electrodos químicamente modificados se ha convertido en una de las herramientas flexibles, modernas y eficientes del análisis electroquímico [1-6]. Sus ventajas se manifiestan en sensibilidad, precisión, exactitud y, principalmente, en la afinidad de materiales modificadores con el analito.

Por un lado, el ácido úrico (es decir, 2,6,8-trihidroxipurina, CAS: 69-93-2) es el producto final del metabolismo de las purinas, no solo en el organismo humano, sino también en algunos animales, como peces, anfibios y serpientes [7], y su producción en el organismo es un proceso genéticamente determinado [8]. Su ausencia causa síntomas de hiperuricemia, asociada a algunos estados dolosos, como el mal de Wilson [9], de Fanconi [10] u otros [11, 12]. Por otro lado, su hiperfunción puede causar otros males, como el de Lesch-Nyhan [13], o la llamada “gota” [14]. Así, el desarrollo de un método de la medición de su concentración en el organismo es un problema de hoy día [15-17].

Se han usado varios modificadores de electrodos para la detección del ácido úrico, como los polímeros conductores [18-21], nanopartículas metálicas y sus compósitos [22-24], derivados ferrocénicos [25, 26], y el oxihidróxido de cobalto, un semiconductor del tipo p, visto por algunos investigadores como una alternativa al dióxido de titanio [27, 28] y usado para detectar las sustancias, cuya oxidación se da en condiciones semejantes [29, 30], también puede ser una buena alternativa.

Sin embargo, las propiedades electroanalíticas de este compuesto recién comenzaron a investigarse, y la tentativa de su aplicación al caso del ácido úrico puede enfrentar problemas como los siguientes:

- la incertidumbre acerca del(los) mecanismo(s) más probable(s) del desempeño de la sustancia modificadora y de la oxidación del analito;
- la posibilidad de inestabilidades electroquímicas, capaces de acompañar la electroxidación y la electropolimerización de ciertos compuestos orgánicos [31, 32], bien como la electrosíntesis del propio $\text{CoO}(\text{OH})$ [33];
- la incertidumbre acerca de la posibilidad de reacciones laterales de la modificadora con otras sustancias, presentes en la solución.

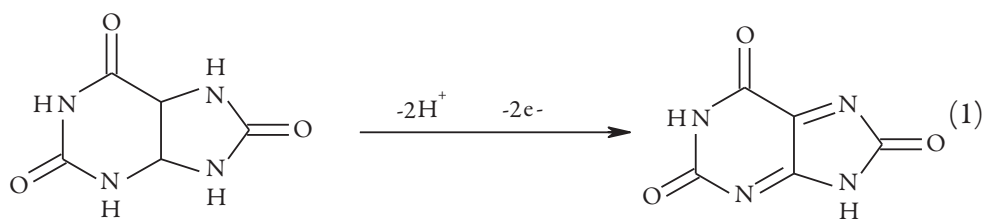
La solución para los mencionados problemas se da mediante el análisis del comportamiento de este sistema desde el punto de vista mecanístico, incluyendo el desarrollo y análisis de un modelo matemático, capaz de describir, de forma adecuada, su comportamiento. El modelo también proporciona la posibilidad de comparar el comportamiento de sistemas análogos sin ensayos experimentales.

Así, el objetivo general de este trabajo es el análisis mecanístico del sistema de la electroxidación del ácido úrico sobre el oxihidróxido de cobalto trivalente. Su realización se da por el alcance de objetivos específicos como:

- la sugerencia de un mecanismo de acción de modificadora;
- el desarrollo de un modelo matemático, basado en los datos del mecanismo;
- el análisis del modelo, con la detección de condiciones de estabilidad del estado estacionario y de inestabilidades electroquímicas;
- comparación del comportamiento del modelo con el de los sistemas semejantes [34, 35].

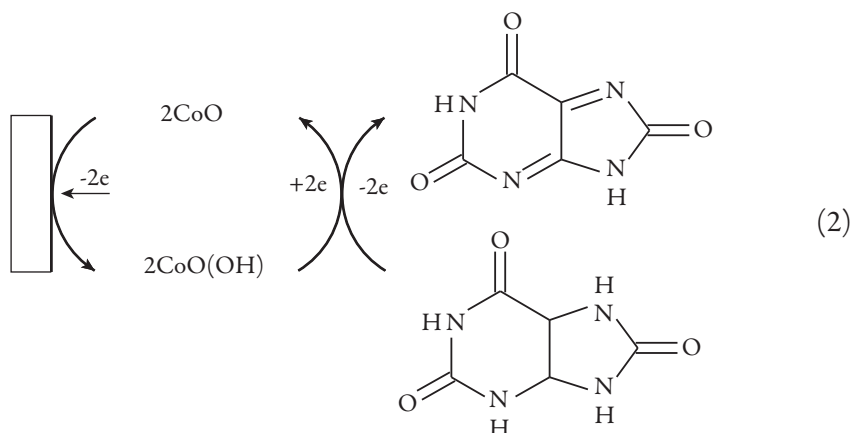
EL SISTEMA Y SU MODELO

Conforme a los datos de literatura [18-26], en la mayoría de los casos, la detección electroquímica del ácido úrico se da en medio neutro, o ligeramente alcalino, según el mecanismo:



Y esta reacción hace que el sistema conjugado en el producto se establezca sin interrupciones.

Con la participación del oxihidróxido de cobalto, el mecanismo se describe en el esquema (2):



Para investigar el comportamiento del sistema analítico en medio neutro y en modo galvanostático, introducimos tres variables:

c = la concentración del ácido úrico en la capa presuperficial;

θ = el grado de recubrimiento de la superficie por el óxido de cobalto bivalente;

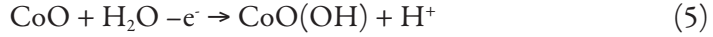
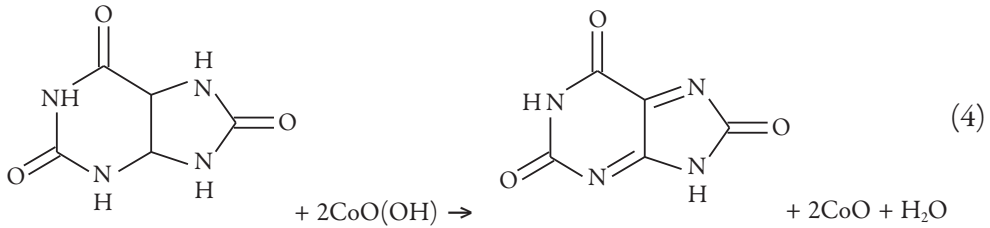
q = la carga del ánodo.

Para simplificar el modelaje, suponemos que evitando la aparición de ecuaciones diferenciales complejas, la solución se agite intensamente (lo que da posibilidad de menospreciar el flujo de convección), de que el electrolito soporte esté en exceso (lo que da posibilidad de menospreciar el flujo de migración). También es supuesto que el perfil de concentraciones de analito y protones en la capa presuperficial sea lineal y el espesor de la propia capa sea constante e igual a δ . Se cree que la concentración de los protones, que aparecen durante la reacción, no es suficiente para influenciar mucho en el sistema.

Es posible demostrar que el comportamiento de este proceso electroanalítico puede describirse por un modelo clásico de tres ecuaciones de balance:

$$\begin{cases} \frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) - r_4 \right) \\ \frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{G} (r_4 - r_5) \\ \frac{dq}{dt} = i - i_F \end{cases} \quad (3)$$

En que Δ es el coeficiente de difusión, c_0 es la concentración del ácido úrico en el interior de la solución, r_4 y r_5 son las velocidades de las reacciones, expuestas en el esquema (2), según lo descrito abajo:



G es la concentración máxima de CoO en la superficie, e i_F es la corriente de Faraday.

Las velocidades de las respectivas reacciones pueden presentarse así:

$$r_4 = k_4 c (1 - 2\theta + \theta^2) \quad (6)$$

$$r_5 = k_5 \theta \exp\left(\frac{F\gamma\theta}{RT}\right) \quad (7)$$

y la corriente de Faraday, como:

$$i_F = Fr_5 = Fk_5 \theta \exp\left(\frac{F\gamma\theta}{RT}\right) \quad (8)$$

Los parámetros k son las constantes de velocidades de las respectivas reacciones, F es el número de Faraday, γ es el coeficiente que describe las relaciones entre la carga del ánodo y el grado de recubrimiento de las respectivas sustancias, suponiéndose que

$\gamma\theta = \varphi_0 = f\eta$ es el salto de potencial, relativo al de carga cero, R es la constante universal de gases y T es la temperatura absoluta.

En el modo galvanostático, el comportamiento será más dinámico que en condiciones potencioestáticas. Sin embargo, aunque haya más factores que colaboran para influenciar el sistema, en el caso del modo potencioestático, el estado estacionario estable también se mantiene con facilidad, lo que será descrito abajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para investigar el comportamiento electroquímico del sistema con la detección electroquímica del ácido úrico, asistida por el oxihidróxido de cobalto trivalente, analizamos el conjunto de ecuaciones diferenciales (3) mediante la teoría de estabilidad lineal. Los elementos estacionarios de la matriz funcional de Jacobi para este sistema serán descritos como:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \quad (9)$$

en que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_4(1 - 2\theta + \theta^2) \right) \quad (10)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (2k_4c(1 - \theta)) \quad (11)$$

$$a_{13} = 0 \quad (12)$$

$$a_{21} = \frac{1}{G} (k_4(1 - 2\theta + \theta^2)) \quad (13)$$

$$a_{22} = \frac{1}{G} \left(-2k_4c(1 - \theta) - k_5 \exp\left(\frac{F\gamma\theta}{RT}\right) - \gamma k_5 \theta \exp\left(\frac{F\gamma\theta}{RT}\right) \right) \quad (14a)$$

$$a_{23} = \frac{1}{G} \left(-fk_5 \theta \exp\left(\frac{F\gamma\theta}{RT}\right) \right) \quad (14b)$$

$$a_{31} = 0 \quad (15)$$

$$a_{32} = -F \left(k_5 \exp \left(\frac{F\gamma\theta}{RT} \right) + \gamma k_5 \theta \exp \left(\frac{F\gamma\theta}{RT} \right) \right) \quad (16)$$

$$a_{33} = -F \left(f k_5 \theta \exp \left(\frac{F\gamma\theta}{RT} \right) \right) \quad (17)$$

Para investigar la estabilidad del estado estacionario, aplicamos al conjunto de ecuaciones diferenciales (3) el criterio de Routh-Hurwitz. Con fines de simplificar los cálculos, evitando la aparición de ecuaciones grandes, introducimos nuevas variables, y el determinante de la matriz se describe como:

$$\frac{2F}{\delta G} \begin{vmatrix} -\kappa_1 - \Xi & X & 0 \\ \Xi & -X - \Omega & -\Lambda \\ 0 & -\Omega & -\Lambda \end{vmatrix} \quad (18)$$

Abriendo los paréntesis y aplicando la condición $\text{Det } J < 0$, saliente del criterio, obtendremos el requisito de estabilidad de estado estacionario, después de eliminar los elementos del módulo igual y signos opuestos, en la forma de:

$$-\kappa_1 X \Lambda < 0 \quad (19)$$

Esta condición se realiza con mayor probabilidad que en los sistemas semejantes [34, 35], ya que los elementos que describían las influencias electroquímicas se eliminan, y, contrariamente a lo observado en [34, 35], no dan influencias a la estabilidad del estado estacionario. Para fines electroanalíticos, ella es correspondiente a la linealidad de la dependencia entre la concentración y el parámetro electroquímico. Así, para la detección del ácido úrico sobre el oxihidróxido de cobalto, el modo galvanostático es eficiente.

El proceso será controlado, mayoritariamente, por la difusión, pudiéndose controlar, en el caso de uso de electrodo pequeño, por la reacción. Algunas restricciones aplicadas al requisito (19), relacionadas con el comportamiento oscilatorio, se discutirán abajo.

Como ninguna de las variables mencionadas en la inecuación (19) puede tener valores nulos, la inestabilidad monotónica, cuya condición principal de aparición es $\text{Det } J = 0$, en este sistema, no se realiza.

Observando las ecuaciones (10), (14) y (17), es posible ver que ellas contienen un elemento, que puede tener valores positivos: $-\gamma k_5 \theta \exp \left(\frac{F\gamma\theta}{RT} \right) > 0$, si $\gamma < 0$, lo que describe

influencias fuertes del proceso de la oxidación electroquímica a la doble capa. Este caso del comportamiento oscilatorio, es el único posible en este sistema y es común para todos los sistemas semejantes [34, 35].

Todavía existiría, teóricamente, el comportamiento oscilatorio, descrito por la positividad del elemento $-F \left(f k_5 \theta \exp \left(\frac{F \gamma \theta}{RT} \right) \right)$, cuando $f < 0$. Sin embargo, el parámetro f solo puede llevarse a negatividad, cuando, durante la aplicación del modo galvanostático, el electrodo cambia su polaridad, lo que, en este proceso, no ocurre. Por eso, las influencias del proceso de la oxidación en la doble capa en el modo galvanostático siguen siendo el único factor responsable por el comportamiento oscilatorio. Las oscilaciones se esperan que sean frecuentes y de pequeña amplitud.

La condición suficiente del comportamiento oscilatorio para este sistema puede describirse así:

$$\frac{-\kappa_1 X \Lambda}{-\kappa_1 - \Xi - X - \Omega - \Lambda} = -(\kappa_1 \Lambda + \Xi \Lambda + X \Lambda + \kappa_1 X + \kappa_1 \Omega + \Xi \Omega) \quad (20)$$

La ecuación (20) puede resolverse, y los significados de los lados derecho e izquierdo solo pueden tener valores opuestos en el caso de la negatividad del parámetro Ω .

Para el caso del *modo potenciodinámico* con voltaje constante, a la tercera ecuación diferencial del modelo se añade otro elemento, que describe la influencia del cambio de la resistencia del material en el ánodo, en la estabilidad del estado estacionario.

Para el *modo potencioestático con decrecimiento de pH*, cuando la concentración de protones crece bastante para intervenir en la estabilidad de CoO o CoO(OH), el modelo también es diferente, añadiéndosele una ecuación de balance que describe el comportamiento de protones. Este caso será descrito en uno de nuestros próximos trabajos.

CONCLUSIONES

El análisis del sistema con la detección del ácido úrico sobre el oxihidróxido de cobalto en el modo galvanostático, dejó la siguiente conclusión:

- CoO(OH) puede ser un modificador eficiente de ánodo para la detección del ácido úrico. El estado estacionario estable es electroanalíticamente eficiente y se mantiene fácilmente. Satisface las condiciones del comportamiento oscilatorio, su manutención es garantizada;

- El proceso electroanalítico es controlado, mayoritariamente, por difusión, o, dependiendo del tamaño del electrodo, por la reacción;
- La inestabilidad monotónica para este sistema, contrariamente a lo observado para sistemas semejantes, no es posible, porque no se pueden satisfacer las condiciones necesarias para su realización;
- La inestabilidad oscilatoria, en este sistema, puede realizarse, siendo causada apenas por los factores de las influencias de la reacción electroquímica a la doble capa eléctrica;
- Para el caso del modo potenciodinámico con voltaje constante, a la tercera ecuación diferencial del modelo se añade otro elemento, que describe la influencia del cambio de la resistencia del material en el ánodo, en la estabilidad del estado estacionario.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no hay conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. C.C. Vishvanatha, B. Kumara Swamy, K. Vasantakumar Pai, Electrochemical studies of dopamine, ascorbic acid and uric acid at lignin modified carbon paste electrode by cyclic voltammetric, *J. Anal. Bioanal. Techn.*, **6**, 237 (2015).
2. J.B. Raoof, A. Kiani, R. Ojani, R. Valliolahi, Electrochemical determination of dopamine using banana-MWCNTs modified carbon paste electrode, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **3**, 59 (2011).
3. M.A. Sheikh-Mohseni, S. Pirsa, Simultaneous determination of dopamine and acetaminophen by a carbon paste electrode doubly modified with poly (pyrrole) and CuO nanoparticles, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 777 (2016).
4. A. Rudbaraki, M.A. Khalilzadeh, Analysis of nitrite using a voltammetric sensors employing NiO nanoparticle modified carbon paste electrode, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 748 (2016).
5. M. Maximiano, C.A. Lima Cardoso, G.J. Arruda, Detecção eletroquímica de carbendazim em sucos de frutas cítricas utilizando eletrodo de pasta de carbono, *Orbital Elec. J. Chem.*, **8**, 232 (2016).

6. P. Manisankar, G. Selvanathan, C. Vedhi, Utilization of polypyrrole modified electrode for the determination of pesticides, *Int. J. Env. Anal. Chem.*, **85**, 409 (2005).
7. M.A. Singer, Dietary protein-induced changes in excretory function: A general animal design feature, *Comp. Biochem. Physiol.*, **134**, 543 (2003).
8. J. Maiuolo, F. Oppedisano, S. Gretteri *et al.*, Regulation of uric acid metabolism and excretion, *Int. J. Cardiol.*, **213**, 8 (2014).
9. E.A. Roberts, M.L. Schilsky, Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update, *Hepatology*, **47**, 2089 (2008).
10. Y. Moriwaki, T. Yamamoto, S. Takahashi *et al.*, Uric acid transport in Fanconi syndrome with marked renal hypouricemia: Analysis using pyrazinamide and benzbromarone, *Nephron*, **74**, 452 (1996).
11. K. Ichida, M. Hosoyamada, N. Kamatani *et al.*, Age and origin of the G774A mutation in SLC22A12 causing renal hypouricemia (en japonés), *Clin. Genet.*, **74**, 243 (2008).
12. G. Bugdayci, Y. Balaban, O. Sahin, Causes of hypouricemia among outpatients, *Labmedicine*, **39**, 550 (2008).
13. R.J. Torres, J. Puig, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome, *Orph. J. Rare Dis.*, **2**, 48 (2007).
14. N. Schlesinger, Diagnosing and treating gout: A review to aid primary care physicians, *Postgrad. Med.*, **122**, 157 (2010).
15. R. Tanaka, Y. Miyata, F. Sakazaki, An improved, highly sensitive HPLC-based method for determining uric acid levels in microliter plasma volumes, *Gout Nucl. Ac. Met.*, **37**, 117 (2013).
16. X. Dai, X. Fang, C. Zhang *et al.*, Determination of serum uric acid using high-performance liquid chromatography (HPLC)/isotope dilution mass spectrometry (ID-MS) as a candidate reference method, *J. Chromatogr. B*, **857**, 287 (2007).
17. H.H. Hamzah, Z.M. Zain, N.L.W. Musa *et al.*, Spectrophotometric determination of uric acid in urine based-enzymatic method uricase with 4-aminodiphenylamine diazonium sulfate (Variamine blue RT salt), *Anal. Bioanal. Techn.*, **11**, 7 (2013).
18. F. Arslan, An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polyaniline-polypyrrole film, *Sensors*, **8**, 5492 (2008).

19. S. Cete, A. Yasar, F. Arslan, An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polypyrrole film, *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Technol.*, **34**, 367 (2006).
20. A. Nur Hasanah, N. Wathoni, A.I. Reflani, Y. Wahyuni, Biosensor for uric acid determination based on combination of polypyrrole and poly(allylamine) films, *J. Young Pharm.*, **6**, 39 (2014).
21. P. Krzyczmonik, E. Socha, Electrodes modified with composite layers of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) and polyaniline (PANI) for applications in bioelectroanalysis, *Chemik*, **87**, 801 (2013).
22. W. He, Y. Ding, W. Zhang *et al.*, A highly sensitive sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on ultra-small Ni nanoparticles, *J. Electroanal. Chem.*, **775**, 205 (2016).
23. B. Fang, Y. Feng, G. Wang *et al.*, A uric acid sensor based on electrodeposition of nickel hexacyanoferrate nanoparticles on an electrode modified with multi-walled carbon nanotubes, *Microchim. Acta*, **173**, 27 (2011).
24. W. Dai, H. Li, M. Li *et al.*, Electrochemical imprinted polycrystalline nickel-nickel oxide half-nanotube-modified boron-doped diamond electrode for the detection of l-serine, *ACS Appl. Mat. Interfaces*, **7**, 22858 (2015).
25. T. Ghosh, P. Sarkar, A. P. Turner *et al.*, Novel third generation uric acid. bio-sensor using uricase electro-activated with ferrocene on a Nafion coated glassy carbon electrode, *Bioelectrochemistry*, **102**, 1 (2015).
26. N. Xia, L. Liu, Zh. Sun *et al.*, Nanocomposites of graphene with ferrocene or hemin: Preparation and application in electrochemical sensing, *J. Nanomater.*, **2015**, ID: 892674, 9 pages (2015).
27. M.S. Burke, M.G. Kast, L. Trotochaud *et al.*, Cobalt-iron (oxy)hydroxide oxygen evolution electrocatalysts: The role of structure and composition on activity, stability, and mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 3638 (2015).
28. C.J. Raj, B. Ch. Kim, W.J. Cho *et al.*, Rapid hydrothermal synthesis of cobalt oxyhydroxide nanorods for supercapacitor applications, *J. Electroanal. Chem.*, **747**, 130 (2015).
29. A. Stadnik, E.M. Caldas, A. Galli, F.J. Anaissi, Eletrodo modificado com [CoO(OH)] coloidal aplicado na detecção de ácido oxálico, *Orbital. Elec. J. Chem.*, **7**, 122 (2015).

30. J.S. Bonini, F.Q. Mariani, E. Guimarães Castro *et al.*, Partículas de CoO(OH) dispersas em pasta de carbono aplicado na eletrooxidação de compostos fenólicos, *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 318 (2015).
31. I. Das, N.R. Agrawal, S.A. Ansari, S.K. Gupta, Pattern formation and oscillatory electropolymerization of thiophene, *Ind. J. Chem.*, **47**, 1798 (2008).
32. K. Aoki, I. Mukoyama, J. Chen., Polymerization and dissolution of polythiophene films, *Russ. J. Electrochem.*, **40**, 319 (2004).
33. O. Stadnik, N. Ivanova, Y. Boldyrev, 218th Int. Electrochem. Soc. Meeting. Abstract # 2240, URL: <http://ma.ecsdl.org/content/MA2010-02/38/2240.full.pdf>, consultado en agosto de 2015.
34. V. Tkach, S.C. de Oliveira, G. Maia *et al.*, The mathematical investigation for the mechanism of the electrochemical oxidation of phenolic compounds over CoO(OH) in alkaline solution, *Mor. J. Chem.*, **4**, 153 (2016).
35. V. Tkach, Ya. Ivanushko, S.C. de Oliveira *et al.*, The theoretical evaluation of the possibility of CoO(OH)-assisted omeprazole electrochemical detection, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 749 (2016).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO:

V.V. Tkach, Y.G. Ivanushko, S.M. Lukanova, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira, R. Ojani, O.V. Luganska, P.I. Yagodynets', Evaluación teórica del desempeño del electrodo, modificado por el oxihidróxido de cobalto (III) en la detección del ácido úrico, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(2), 289-300 (2018).

RESÚMENES DE LAS PRESENTACIONES DEL IV ENCUENTRO DE INVESTIGACIÓN DE LA ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE INMUNOLOGÍA (ACOI), REALIZADO EN NEIVA, COLOMBIA, EL 15 Y 16 DE MARZO DE 2018

PRESENTACIONES ORALES

A low degranulation ability of activated CD8⁺ T cells is associated with the persistent systemic immune activation in HIV-infected patients, despite viral suppression induced by the anti-retroviral therapy

Federico Perdomo-Celis¹, Natalia A. Taborda^{1,2}, María T. Rugeles¹.

¹ Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, UdeA, Medellín, Colombia.

² Grupo de Investigaciones Biomédicas Uniremington, Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Remington, Medellín, Colombia.

Immune activation is the hallmark of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection, identified by the expression of cellular markers such as HLA-DR and CD38, and plasma molecules such as soluble CD14 (sCD14), that remain increased despite the viral control induced by the highly active anti-retroviral therapy (HAART). This hyper-activation induces dysfunction in immune cells, including CD8⁺ T cells, that might contribute to the development of therapy failure. Particularly, a low degranulation ability and production of cytotoxic molecules by CD8⁺ T cells has been observed in untreated HIV-infected patients, but the reconstitution of the response of these cells, in the setting of HAART-induced viral suppression and its relation with the immune activation state is unclear. In this study, we aimed to evaluate the effect of HAART on the degranulation ability and production of cytotoxic molecules and interferon (IFN)- γ by CD8⁺ T cells from HIV-1-infected patients and the association with the activation state. By flow cytometry, we characterized the functionality of activated CD8⁺ T cells (HLA-DR⁺ and/or CD38⁺) by measuring the degranulation ability (expression of CD107a), *de novo* production of cytotoxic molecules (CD107a plus granzyme B and/or perforin) and the expression of IFN- γ . In addition, plasma levels of sCD14 were evaluated by ELISA. Peripheral blood mononuclear cells stimulated *ex vivo* with PMA-ionomycin were analyzed in 30 HIV-1-infected patients receiving HAART (viral load <50 HIV RNA copies/mL), and compared with cells from 10 seronegative healthy

individuals. After stimulation, the expression of CD107a and production of IFN- γ and *de novo* granzyme B and perforin by total CD8⁺ T cells was similar between HIV-1-infected and seronegative individuals. Although in basal conditions, total CD8⁺ T cells exhibited similar levels of activation in both groups, after polyclonal stimulation, HIV-1-infected patients had a higher frequency of HLA-DR⁺ CD38⁺ CD8⁺ T cells, characterized by a low expression of CD107a and *de novo* granzyme B and perforin. In addition, sCD14 levels were increased in HIV-infected patients and negatively correlated with the frequency of HLA-DR⁺ CD38⁺ CD107⁺ CD8⁺ T cells. Our findings suggest that the degranulation ability and *de novo* production of cytotoxic molecules by activated CD8⁺ T cells is impaired in HIV-1-infected patients despite HAART-induced viral suppression, indicating partial immune reconstitution, and these alterations are associated with a persistent systemic immune activation.

Sequential dengue and Zika virus infection induce a higher neutralizing activity and stronger T-cell responses against Zika virus

Félix Delgado^{1,3}, Karina Torres¹, Jaime Castellanos¹, Consuelo Romero-Sánchez², Etienne Simon-Lorière^{3,4}, Anavaj Sakuntabhai^{3,4}, Claude Roth^{3,4}

¹ Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, D. C., Colombia.

² Unidad de Investigación Básica Oral, Universidad El Bosque, Bogotá, D. C., Colombia.

³ Functional Genetics of Infectious Diseases Unit, Institut Pasteur, Paris, France.

⁴ CNRS URA 3012, F-75724 Paris, France.

The high level of dengue seroprevalence in areas where Zika virus (ZIKV) is circulating have raised concerns on the risk of increased Zika disease severity for patients with a history of previous dengue virus (DENV) infection. Recent studies have shown that anti-DENV pre-existing antibodies may enhance ZIKV infection and increase disease severity. However, little has been shown about the ability of these antibodies to neutralize ZIKV in the same context and regarding the T cell epitopes that are specific or shared between both of these viruses. Given these facts, to determine the role of DENV pre-immunity in ZIKV infection, the aim of this study was to analyze the T and B cell responses against ZIKV. Using PBMC from blood donors with previous history of DENV/ZIKV or ZIKV infection, we have identified ZIKV epitopes by screening T-cell responses against overlapping peptides spanning the ZIKV proteome by IFN- γ enzyme-linked immunospot analysis. Furthermore, plasma samples were analyzed to quantify the neutralizing and enhancing activities of antibodies against DENV and ZIKV infections using a flow cytometry-based assay. Our results show that the ZIKV non-structural proteins NS1, NS3 and NS5 contain most of the immunodominant

peptides that induce a strong T-cell response. Interestingly, in donors with a history of DENV infection, specific peptides were also identified as DENV CD8+ T-cell epitopes and the strongest T-cell responses observed in these donors correspond to sequences with a high level of amino acid identity with the four serotypes of DENV. These results strongly support the activation of cross-reactive T-cells in this context. Additionally, plasma samples from ZIKV-infected donors exhibited neutralizing activity only against ZIKV, and one donor showed enhancing activity for DENV4 infection. The highest neutralizing activity against ZIKV infection was observed in samples from donors with previous DENV infection, strongly suggesting the induction of cross-reacting antibodies induced upon sequential DENV and ZIKV infection. These data have crucial implications for future ZIKV and DENV vaccines and provide new opportunities to study the role of subsets of DENV- or ZIKV-specific T cells in the induction of broadly neutralizing antibodies in the context of sequential flavivirus infections, which could modulate disease severity.

Reduction in the frequency of IL10-producing B lymphocytes in patients with atherosclerosis

Héctor Rincón-Arévalo¹, Julio Quintero¹, Mauricio Rojas^{1,2}, Fernando Fortich³, Gloria Vásquez^{1,4}, Lina Yassin⁵, Diana Castaño¹

¹ Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia UdeA, calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia.

² Unidad de Citometría, Facultad de Medicina, sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia.

³ Sección de Cardiología. Hospital Universitario San Vicente Fundación. Medellín, Colombia.

⁴ Grupo de Reumatología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁵ Grupo de Investigaciones Biomédicas. Corporación Universitaria Remington. Medellín, Colombia.

E-mail contacto: diana.castano@udea.edu.co, yascatorce@yahoo.com.

Financiación: Este trabajo recibió financiación de Colciencias (Proyecto No. 1115544 31390), Sostenibilidad de la Universidad de Antioquia y del Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias.

Introduction: Atherosclerosis is a systemic inflammatory process characterized by the accumulation of lipids and infiltration of immune system cells in the intima. B cells have been attributed both a protective and proatherogenic role, which apparently depends on the subpopulation involved and the previous antigenic contact. During the last years, the existence of B cells with the ability to regulate the secretion of TNF- α

and IFN- γ by T cells through the production of IL-10 in the context of different inflammatory diseases has been described.

Objective: To compare the frequency, phenotype and regulatory function of some circulating B cell subsets, between patients with atherosclerosis and low cardiovascular risk controls.

Methodology: Circulating mononuclear cells were obtained from patients with atherosclerosis and controls. B cells were characterized into immature, transitional, mature, memory and plasmablast subsets and were cultured using two methodologies. *Ex vivo*: 5 h with Lipopolysaccharide (LPS) or CpG in presence of phorbol myristate acetate (PMA), Ionomycin and Brefeldin A (PIB). *In vitro*: 48 h with anti-CD40 and restimulation in the last 5 h with LPS or CpG in presence of PIB. Cells were labeled with monoclonal antibodies and acquired in the flow cytometer. In each subpopulation, the positivity for IL-10 was evaluated. In some cultures, each B cell subset was selectively removed from mononuclear cells and stimulated for 48 h with anti-CD3 ϵ . In the last 5 h, restimulation with PIB was performed. The frequency of CD4 + TNF- α + and IFN- γ + T cells was evaluated, in presence or absence of an IL-10R blockage.

Results: There were no differences in the distribution of B cell subsets between the study groups. In patients, increased frequency of CD40+ transitional, mature and memory cells, and CD80+ transitional and mature subsets were found. Reduction in the total frequency of IL-10+ B cells was found in patients with atherosclerosis compared to healthy controls, in both the *ex vivo* culture and *in vitro* stimulated with LPS or CpG. That reduction was observed in the immature, transitional, mature and memory subsets with both types of culture stimulated with LPS. The stimulation with CpG induced reduction in all *ex vivo* evaluated subsets, while in *in vitro* culture this stimulation induced reduction of immature, mature and memory B subsets. It was observed that *ex vivo* and *in vitro*, the CD4+ T cells from patients showed higher frequency of TNF- α + cells in cultures under B cell subsets depletion compared with controls. No differential effect was observed with the presence of the IL-10R blockage.

Conclusion: These results suggest that atherosclerotic patients present altered regulatory capacity of some circulating B cells, which could contribute to the chronic inflammatory process present in atherosclerotic plaques.

Role of microparticles from patients with systemic lupus erythematosus in the induction of inflammatory mediators in monocytes

Karen Álvarez¹, Blanca Lucía Ortiz¹, Adriana Vanegas-García³, Carlos H. Muñoz-Vahos³, Mauricio Rojas^{1,2}, Gloria Vásquez¹

¹ Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, calle 70A No. 52-21, Medellín-Colombia.

² Unidad de Citometría de Flujo, sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, calle 70A No. 52-21, Medellín-Colombia.

³ Grupo de Reumatología de la Universidad de Antioquia.

Financial support: Colciencias project number 1115-569-33389.

Background: Microparticles (MPs) are small vesicles mainly produced during cell activation and apoptosis; they contain several components of parent cells and possess a wide spectrum of biological activities on intercellular communication. Higher levels of MPs have been reported in SLE and distinct groups of proteins, especially immunoglobulins, complement components and damage-associated molecular patterns (DAMPs) are increased in MPs from SLE patients. Several studies suggest that the recognition of MPs by immune cells could contribute to the chronic inflammatory process seen in SLE. We propose that MPs can be internalized by different populations of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). It is known that monocytes contribute to the clearance and depuration of dead cell-derived materials, and have an important role in the development of SLE. We propose that MPs from SLE patients can be internalized by monocytes and can induce the production of inflammatory mediators.

Methods: MPs were isolated from platelet-poor plasma from SLE patients and healthy controls. We evaluated by flow cytometry the union/internalization by PBMC of MP labelled with carboxyfluorescein succinimidyl ester. Monocytes were stimulated with MPs from different source. Cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6 and IL-10) and eicosanoids (prostaglandin E2 (PGE2) and Leukotriene B4 (LTB4)) production were determined by flow cytometry and ELISA, respectively.

Results: MPs were mainly internalized by monocytes rather than T and B lymphocytes. Monocytes and B lymphocytes of SLE patients presented decreased MP union/internalization compared to healthy controls. Monocytes treated with patients-derived MP exhibited high IL-6, IL-1 β , LTB4 and PGE2 levels compared with monocytes treated with control-derived microparticles.

Conclusion: Circulating MPs from SLE patients could be internalized by monocytes inducing the production of inflammatory mediators, which could contribute to the chronic inflammatory process seen in SLE.

Association between carbamylated antibodies to specific epitopes of the human fibrinogen β -chain in early Rheumatoid Arthritis

Chila-Moreno L.³, Rodríguez L.S.⁴, De Ávila J.³, Bautista-Molano W.^{2,3}, Bello-Gualtero J.M.^{1,2}, Romero-Sánchez C.^{1,2,3}

¹ Hospital Militar Central, Bogotá-Colombia.

² Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá-Colombia.

³ Universidad El Bosque, Bogotá-Colombia.

⁴ Pontificia Universidad Javeriana.

Background: Post-translational modifications such as carbamylation in rheumatoid arthritis (RA) is involved in the generation of auto-antigens, carbamylated proteins change their lysines by homocitrulines and activate T cells inducing the formation of autoantibodies. Recently anti carbamylated antibodies are associated with the severity of the disease, however, the precise target antigen of anti-CarP antibodies has not been elucidated. The objective of this study was to determine the frequency of specific antibodies directed against a homocitrulinated peptides of the fibrinogen beta chain and associate them with rheumatic indices in patients with early RA (ARt).

Methods: A cross-sectional study involving 51 RA Patients with the diagnosis of early rheumatoid arthritis (eRA) were studied at the Hospital Militar Central in Bogota-Colombia. Three peptides of the β chain of human fibrinogen were selected, and the epitope prediction was made by Bitered, BepiPred 1.0 for B cell epitopes, and for the selection of T epitopes, the ProPred and MHCpred programs, the epitopes that having a BCPreds cutoff score >0.8 were selected, to finds regions of local similarity between sequences we used BLAST Uniprot. We synthesized a native peptide (anti-Fib1) 37-52 [NEEGFFSA RHRPLDKK] as a control and two modified peptides (anti-Ca-Fib2) [NEEGFFSAHomoCitHRPLDKK] with a homocitrulin at position 45 and (anti-Ca-Fib3) with a homocitrulline at position 52. Regions of similarity between sequences were analyzed by PSI-BLAST Uniprot- Disease activity was assessed by scales DAS 28. The comparison was made by McNemar and Wilcoxon test and the association was made by chi-square, fisher test and U Mann Whitney. this study was support by the Hospital Militar Central -2015-047. .

Results: Fifty-one patients diagnosed with eRA were evaluated, had an mean age of 48.55 ± 10.93 years, the highest proportion were women in 80.4%. The presence of comorbidities was in 54.9% of patients. A higher frequency of anti-FCS-Carp positive was found in the group of eRA compared to the control group (CTRL) (47.1% vs. 17.8%, respectively, OR 7.6 95% CI: 2.3-39.88 $p = 0.0001$). The frequency of the

antibodies against the carbamylated peptides was as follows: the anti-Ca-Fib2 positives were also found in a higher percentage 47.1% eRA vs 13.7% in CTRL (OR 6.6 95% CI: 1.97-35.0 $p = 0.0005$) while no differences were found in the frequency of anti-Ca-Fib3 between eRA and CTRL. (31.4% vs 21.6% respectively OR 1.71 95% CI: 0.62-5.13, $p = 0.359$), additionally, anti-Fib1 $\geq 1/50$ antibody titers were found in 68.6% of ART vs. 15.7% in CTRL (OR 6.4 95% CI: 2.47- 21.04 $p = 0.001$ showing the autoimmune burden in this disease. The anti-Ca-Fib2 antibodies were associated with positive RF ($p = 0.022$) and with ACPA > 60 U ($p = 0.032$), The anti-Ca-Fib3 was associated with the activity index of the disease DAS28-VSG ($p = 0.046$), Statistically significant differences were found between the presence of anti-Ca-Fib3 and anti-Ca-Fib2 antibodies ($p = 0.001$), no associations were found with the anti-peptide antibodies with serological markers, however the 23,52% had RF+ APCA+ anti-Ca-Fib2+ and 1,72% had RF+ APCA+ anti-Ca-Fib3+..

Conclusions: humoral response in ARt may be restricted to specific regions of the fibrinogen β - chain that contain homocitrullines and may be considered in the future as a biomarker of this disease in a subgroup of patients. In addition, the response of the different peptides was not similar, point toward that the carbamylation site may have an influence on the recognition and generation of these antibodies.

Sulfasalazine promote the production of IL-17 by CD8⁺ T cells from human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infected patients on highly active antiretroviral therapy (HAART), *in vitro*

Manuel G. Feria¹, Federico Perdomo-Celis¹, Natalia A. Taborda^{1,2}, María T. Rugeles¹

¹ Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, UdeA, Medellín, Colombia.

² Grupo de Investigaciones Biomédicas Uniremington, Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Remington, Medellín, Colombia.

Immune activation, main immunopathogenic mechanism of HIV-1 infection, is caused by several factors, including intestinal microbial translocation. This phenomenon, at least in part, is due to the decrease and/or dysfunction of interleukin (IL)-17-producing T cells, a cytokine that promotes the integrity of the intestinal barrier. Among IL-17-producing cells, it has been described a population of CD8⁺ T cells (Tc17 cells); however, its relation with microbial translocation and immune activation during HIV-1 infection is unknown. Until now, we had demonstrated that during HIV-1 infection there is a lower frequency of circulating Tc17 cells that are characterized by an activation state and by their ability to produce low levels of IL-17, despite of the viral

suppression induced by HAART. Therefore, the search of therapies that modulate this process and reverse the dysfunctionality of Tc17 cells, constitute an important field of research. In this sense, there is the possibility that sulfasalazine (SSZ), an anti-inflammatory component used empirically, but successfully in HIV-1-infected patients, can restore the function of Tc17 cells, contributing to decrease microbial translocation. Thus, here we aimed to evaluate the effect of SSZ on the immune activation and the production of IL-17 by Tc17 cells from HIV-1-infected patients under viral suppression by HAART. In peripheral blood mononuclear cells (PBMC), from HIV-1-infected patients on HAART and healthy donors, treated with LPS in the presence or absence of 1mM SSZ and stimulated with PMA and ionomycin, the immune activation (expression of HLA DR and CD38) and the production of IL-17 in Tc17 cells were determined by flow cytometry. Additionally, in the supernatants of cell cultures, the IL-1 β levels were quantified by ELISA. The immunomodulatory effect of SSZ was evidenced by the decrease in the IL-1 β levels in supernatants of cell cultures. Additionally, it was observed that SSZ induced the death of HLA-DR⁺ CD38⁺ CD8⁺ T cells and an increase of the frequency of total Tc17 cells in HIV-1 infected patients. Similarly, the frequency of IL-17-producing HLA-DR⁻ CD38⁺, HLA-DR⁺ CD38⁺ and HLA-DR⁺ CD38⁻ CD8⁺ T cells increased after SSZ treatment. Remarkably, after the treatment with SSZ, the frequency of activated HLA-DR⁺ CD38⁺ Tc17 cells from HIV-1-infected patients reached similar levels to those obtained in healthy individuals. Finally, in the presence of SSZ, the frequency of HLA-DR⁺ CD38⁺ Tc17 cells was positively correlated with the frequency of non-viable HLA-DR⁺ CD38⁺ CD8⁺ T cells and negatively correlated with the frequency of total HLA-DR⁺ CD38⁺ CD8⁺ T cells and IL-1 β levels. Thus, we suggest that SSZ inhibits the release of IL-1 β , limiting the activation of CD8⁺ T cells, favoring the increase of the frequency of Tc17 cells.

Humoral immune response against synthetic peptides derived from LACK and KMP-11 proteins from *Leishmania* spp.

Sánchez Lizeth Paola, Flórez Magda Melissa, Delgado Gabriela

Grupo de Investigación en Inmunotoxicología, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

Introduction: Leishmaniasis is a parasitic disease caused by the intracellular protozoan *Leishmania* spp., and it affects about 1.2 million people in the world, including Colombia, where about 10,000 cases occur each year, being the most prevalent clinical form cutaneous leishmaniasis in 95-98% of cases. As a control strategy for this disease it is necessary to identify epitopes of the parasite, that can be useful as well as candidates for more sensitive and specific diagnosis than conventional ones, by using synthetic

peptides. Therefore, our objective was to evaluate the production of antibodies against synthetic peptides derived from LACK and KMP-11 proteins of *Leishmania spp.* in patients with a clinical history of leishmaniasis.

Materials and Methods: The presence of total IgG as well as the subclasses of IgG was evaluated in sera against 5 synthetic peptides derived from LACK protein and 5 from KMP-11 protein of *Leishmania spp.* The human volunteers were classified in different clinical groups according to their history of leishmaniasis as follows: *i*) individuals with active cutaneous leishmaniasis; *ii*) Individuals positive leishmanin skin test without clinical signs; *iii*) leishmanin skin test negative individuals; *iv*) individuals with completed treatment and *v*) individuals with Chagas disease. The antibodies were detected by ELISA technique.

Results: The evaluation of reactivity of the sera against the soluble antigen of *Leishmania* (SLA), showed antibody titers in 66.6% of active individuals, in the other groups no detectable antibody titres were found. 50% of reactivity in active leishmaniasis volunteers were observed against each LACK and KMP-11 recombinant proteins. On the other hand, from the 10 synthetic compounds evaluated derived from LACK and KMP-11, LACK_{xx-xx}, KMP-11₆₁₋₈₀ and LACK₁₂₁₋₁₄₀ showed the highest reactivity in sera from individuals with active cutaneous leishmaniasis, (77.7%, 55.5% and 44.4% respectively). Additionally, the cross-reaction with Chagas disease ranged between 0-20%. About the detection of IgG subclasses, it was observed that for SLA, the 4 subclasses of IgG were found, with a slight increase of IgG3. Against KMP-11₆₁₋₈₀ was observed predominance of IgG1 and IgG4, for LACK_{xx-xx} was observed predominance of IgG3 and slightly IgG1 and finally, LACK₁₂₁₋₁₄₀ did not show a characteristic subclass pattern.

Conclusions: We conclude that, the identification of peptide sequences was achieved, as natural epitopes in the infection by *Leishmania spp.*, representing, immunodominant linear epitopes of the proteins LACK and KMP-11, in human B cells, since they induce a marked production of antibodies after natural exposure to the parasite. The experimental approach used here may be useful for the characterization of immunogenic epitopes for the study of diagnostic candidates for leishmaniasis.

Immunoproteomic identification of the G3PDH and P α 3S proteins as potential candidates for a molecularly-defined vaccine against cutaneous leishmaniasis

Christian Piedrahíta-Ochoa, Lina Orrego, Paula Correa, Janny Villa, José R. Ramírez-Pineda

Grupo Inmunomodulación (GIM), Universidad de Antioquia.

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a highly prevalent parasitic disease in tropical countries like Colombia. Current control strategies against CL are suboptimal and the most promising preventive strategy that can be envisioned is the development of an effective vaccine. By using a murine model of LC by *Leishmania (Viannia) panamensis* (Lp) we observed the development of progressive cutaneous ulcers during the first 5-6 weeks, with a subsequent plateau and stabilization by the weeks 7-10 post-infection. Lesion stabilization was associated with maximal levels of IFN- γ production in spleen cells. Moreover, mice cured the lesions by week 15-20 and were immune to reinfection. Based on these observations, we hypothesized that a humoral immunoproteomic approach that detects IgG2a antibodies would allow the identification of IFN- γ -inducing antigens and vaccine candidates. BALB/c mice were infected and the auto-resolutive and immunity-inducing character of the model was confirmed. By using ELISA and western blot, increasing anti-Lp IgG2a antibody reactivity was observed, with maximal levels at the 9th week post-infection. With serum pools from the same animals we identified 22 antigens with a preferential IgG2a immunoreactivity by using 2D/GE/MS and western blot. Two antigens, the Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase (G3PDH) and the Proteasome 3 alpha Subunit (P α 3S) were selected to be cloned and produced as recombinant proteins. Polyclonal sera were also risen against recombinants and both were shown to recognize proteins with the expected molecular weight and localization in parasite lysates and intact promastigotes by immunoblot and immunofluorescence microscopy, respectively. G3PDH and P α 3S-reactive IgG2a antibodies were evidenced in serum samples from infected mice by ELISA and immunoblot, validating the pattern previously observed with native parasite protein in 2D gels. Of more importance, spleen and/or lymph node cells from 10-week-infected mice were stimulated to produce IFN- γ in response to recombinants or to pools of overlapping synthetic peptides derived from the protein sequences. Finally, serum samples from cured/reinfected mice recognized rG3PDH and rP α 3S with a biased IgG2a over IgG1 reactivity. Altogether, our results indicate that using an humoral immunoproteomic approach that detects IgG2a antibodies is possible to identify antigens able to induce IFN- γ (Th1 response) in infected mice, which, in turn, can be proposed as potential vaccine candidates for a molecularly-defined vaccine. The prophylactic efficacy of the G3PDH and P α 3S proteins is currently being investigated.

PRESENTACIONES EN FORMA DE PÓSTER

Prediction of binding of Peptidyl arginine deiminase citrullinated peptides of *Porphyromonas gingivalis* with hypervariable regions of Immunoglobuline G. A Rheumatoid arthritis and periodontal disease model: In-silico Docking approach

Mónica Acevedo^{1,2}, Paula Hernández^{1,5}, Adriana Amaya^{1,2}, Diana M. Castillo P.², J.E. Castellanos^{1,4}, J. Bello-Gualtero³, W. Bautista-Molano^{2,3}, Consuelo Romero-Sánchez^{1,2,3}

¹ Master in Biological Science Program, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

² Unit of Basic Oral Investigation (UIBO), School of Dentistry, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

³ Rheumatology and Immunology Department, Hospital Militar Central. Clinical Immunology Group, School of Medicine, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia.

⁴ Virology Group, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

⁵ Parasitology Lab., Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic chronic inflammatory disease characterized by the presence of IgG against citrullinated peptides which are the most specific clinical markers used in the diagnosis of the disease. The periodontal disease commonly caused by *Porphyromonas gingivalis* is associated with RA. These bacteria express Peptidylarginine Deiminase (PPAD); this enzyme is capable of exchanging arginine for citrulline in some proteins. Similar situation occurs in human PAD. Such modifications can alter the tertiary structure and expose epitopes that can be recognized by IgG antibodies.

Objective: To evaluate the geometric complementarity and estimates the interface area of the complex and atomic contact energy (ACE) between PPAD peptides with the hypervariable regions of IgG(HVG) in the in-silico docking model.

Methods: Four peptides of PPAD epitopes recognized by B cells were selected on Bcepred y ABCpred and for T lymphocytes on ProPred and MHCpred: 1. native, 2. with citrullination in Arg1 of the C-terminal end, 3. citrullination in Arg1 of C-terminal and the Arg8 and 4. with aminoacid sequence in random disposition. 3D modelling of peptides was carried out using PEP-FOLD Server and the citrullines were added with ACD/ChemSketch. The modelling of variable domains in HVG(GenBank:CAB44207.1) and light chain(GenBank:BAE98205.1) was obtained with the SwissModel server. The amino acids of the HVG capable of interacting were defined using The ConSurf Server tool. The peptides and variable domains were prepared using Openbabel. Docking used Patchdock. The PyMOL tool was used to rendering the structural complexes.

Results: The native peptide1 has a higher score in the interaction with the light chain, and the heavy chain shows a higher score with the peptide3. Peptide3 has lower ACE for both heavy and light chain therefore interaction is more stable. Aminoacids of contact area of heavy chain that interact with all peptides are Tyr50, Leu98, Trp103, Asn104, Gly106, Phe107, Asp108 and of the light chain are Ser95, Pro96, Gly97, Phe98 and Gly99. The interactions of the light chain and peptide1 were: Arg1 interacts with Gly100, and Arg8 with Glu1 and for peptide3: Cit8 with Thr10 (Cit1 has no contact). Regarding the heavy chain, peptide1 interacts with Arg1 and Trp47 while for peptide3: Cit1 with Lys43, and Cit8 with Pro40. The citrullinated residues of Peptide2 do not interact with the amino acids of HVG but they do with others amino acids in the contact area.

Conclusions: The In-silico model shows that bacterial PPAD peptides with and without citrullination were capable of interacting with human HVG. The citrulline influence the contact area between the hypervariable regions of heavy and light chains. Peptides with modifications of two arginine residues by citrulline, present a higher interaction score and lower ACE, predicting the recognition for IgG. This could be a proposal of RA and periodontal disease pathogenic interaction model.

Acknowledgments

This study was supported by the Universidad El Bosque (PCI 2016-8806), the Hospital Militar Central (2015-047), the Government Institute of Science, Technology, and Innovation, Francisco Jose de Caldas—COLCIENCIAS (Grant No. 130865740792-2014) and Colombian Rheumatology Association.

Microparticles from systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients as inducers of endothelial damage

Laura Atehortúa Castro^{1,2}, Mauricio Rojas^{1,2}, Gloria Vásquez^{1,3}, Carlos H. Muñoz³, Adriana Vanegas³, Rafael Andrés Posada-Duque⁴, Diana Castaño^{1*}

¹ Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia UdeA, calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia.

² Unidad de Citometría, Facultad de Medicina, SIU, Universidad de Antioquia UdeA, calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia.

³ Sección de Reumatología, Hospital Universitario de San Vicente Fundación, calle 64 No. 51D-154, Medellín, Colombia.

⁴ Grupo de Neurociencias de Antioquia, Instituto de Biología, Facultad de Medicina, SIU, Universidad de Antioquia UdeA, calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia.

* Corresponding author: diana.castano@udea.edu.co.

Rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) are autoimmune diseases with a high endothelial involvement of macro vasculature that manifests with the accelerated development of atherosclerosis and cardiovascular diseases. In addition, they also present an evident endothelial compromise of the micro vasculature, mainly in the organs where the ultrafiltration processes occur. It has been proposed that different components that are common to the immunopathology of RA and SLE, such as auto-antibodies and immune complexes (ICs), should participate in the endothelial damage observed in these patients. Taking this in consideration, we propose that microparticles (MPs), vesicular structures that are increased in the circulation of these patients and form IC (MPs-ICs), could play a role in the induction of endothelial damage. Therefore, our aim was to evaluate the effect of MPs and MPs-ICs from patients with RA and SLE in endothelial cells of micro and macro vasculature.

Primary endothelial cells were cultured for 24 h in the presence or absence of MPs and MPs-ICs isolated from patients with RA and SLE and healthy controls. The production of soluble mediators and the expression of CD54, CD102 and HLA-DR were evaluated by ELISA and flow cytometry, respectively. In addition, the adhesion of classical and non-classical monocytes to the endothelium, the structure and arrangement of the endothelial monolayer (actin filaments and expression of VE-Cadherin), as well as the viability of these cells were studied by epifluorescence microscopy. Finally, the permeability of the endothelial monolayer to dextran was measured by spectrofluorometry.

It was found that MPs and MPs-ICs induced the expression of CD54 and CD102, the production of IL-6 and IL-8 cytokines, and CCL2 and CCL5 chemokines in macro and micro vasculature cells; a higher proportion of classical monocytes was adhered to macro vascular endothelial cells previously treated with MPs and MPs-ICs. Also, these vesicles decreased the expression of VE-cadherin in membrane, induced the depolymerization of actin filaments, and increased the number and size of intercellular spaces. In addition, some endothelial cells died in response to these vesicles, evidenced with fragmentation and condensation of nuclei. These results can explain the increase in endothelial permeability that was observed in response to MPs and MPs-ICs from these patients.

These results show that MPs and MPs-ICs from patients with RA and SLE induce the activation and damage of endothelial cells and participate in the recruitment and adhesion of monocytes to these cells. The increase in the amount of these structures in the circulation of these patients could contribute to endothelial dysfunction, the increase in atherosclerotic plaques, as well as facilitate the recruitment of leukocytes to the organs that are affected in these diseases.

Subpopulations of peripheral blood monocytes in individuals with chronic Chagas disease

Sergio Gómez-Olarte^{1,2}, Natalia Bolaños¹, Mariana Echeverry¹, Juan Vargas¹, Gabriel Durán¹, Adriana Cuéllar³, Concepción Puerta⁴, Alejandro Mariño⁵, John González¹

¹ Grupo de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

² Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

³ Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

⁴ Laboratorio de Parasitología Molecular, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

⁵ Clínica de Falla y Trasplante Cardíaco, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, Colombia.

Introduction: Human monocytes are a heterogeneous cellular population participating in tissue inflammation, repair and patrolling. This cellular population has been classified into three subsets with differential functions based on the expression of CD14 (LPS receptor) and CD16 (low affinity receptor for IgG): classical (CD14++ CD16), intermediate (CD14++ CD16+) and non-classical (CD14+ CD16++). Changes in the percentage of peripheral blood monocytes have been associated with the pathophysiology of viral, bacterial and parasitic infections. It was reported the expansion of CD14+ CD16+ monocytes in asymptomatic children, adults with acute and recent chronic infection by *T. cruzi*. However, variations in the percentage of monocyte subpopulations in chronic Chagas disease have not been evaluated. Therefore, this work is aimed to study if there is any pattern in the alterations of monocytes subpopulations, this could allow the identification of cellular markers for the follow-up of chronically infected individuals.

Materials and methods: The study included Colombian adults with chronic Chagas disease (CCC) who attended the Heart Failure service at the University Hospital San Ignacio (HUSI) in Bogotá between 2015 and 2018, as well as patients with non-Chagas cardiomyopathy (CNC) and healthy individuals without antibodies to *T. cruzi* (CS) paired by sex and age, as control groups. Individuals with history of neoplasms, autoimmune or endocrine diseases and acute infections were excluded. All volunteers were screened by two serological tests for antibodies against *T. cruzi*, also clinical and cardiac functional evaluation were carried out. Peripheral blood mononuclear cell (1×10^6 cells per tube) were obtained, blocked with anti-CD16/32 and human serum

AB, and labeled with anti-CD14 PE, anti-CD16 PE-Cy7 and anti-HLA-DR FITC or the corresponding isotype control. 50,000 events were acquired in a FACSCanto II flow cytometer on the HLA-DR+ population, and the CD14/CD16 subpopulations were gated. The comparison between multiple groups were performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test in the GraphPad Prism 7 software ($p < 0.05$).

Results: The analysis included 21 samples of patients with Chagas disease, 13 with non-Chagas cardiomyopathy and 11 healthy. The percentage of classical monocytes decreased in patients with chronic Chagas disease ($84.8 \pm 4.5\%$) compared with non-chagasic cardiopaths ($90.2 \pm 4.6\%$, $p=0.0147$) and healthy controls ($89.1 \pm 3.3\%$; $p=0.0225$), while the percentage of the intermediate subpopulation increased in chronic chagasic patients ($10.2 \pm 3.5\%$) compared with non-chagasic cardiopaths ($5.5 \pm 2.3\%$, $p=0.0020$) and healthy individuals ($6.5 \pm 2.0\%$, $p=0.0339$). The analysis of the CD16+ subpopulation (intermediate and non-classical monocytes), named inflammatory, revealed an increase in chronic chagasic patients ($15.2 \pm 4.5\%$) compared with non-chagasic cardiopaths ($9.8 \pm 4.6\%$; $p=0.0147$) and healthy individuals ($10.9 \pm 3.3\%$, $p=0.0225$) (Fig. 1). When we analyzed multiple samples of three patients with chagasic cardiomyopathy, it was observed individual changes in the percentages of monocyte subpopulations according to the time (months or years) of sampling (Fig. 2).

Conclusions: Chronic Chagas patients have an increased percentage of inflammatory monocyte populations (intermediate and CD16+) and a reduction in reparative (classical) monocytes. These variations in the monocytes subpopulations could be correlated with clinical features of the disease.

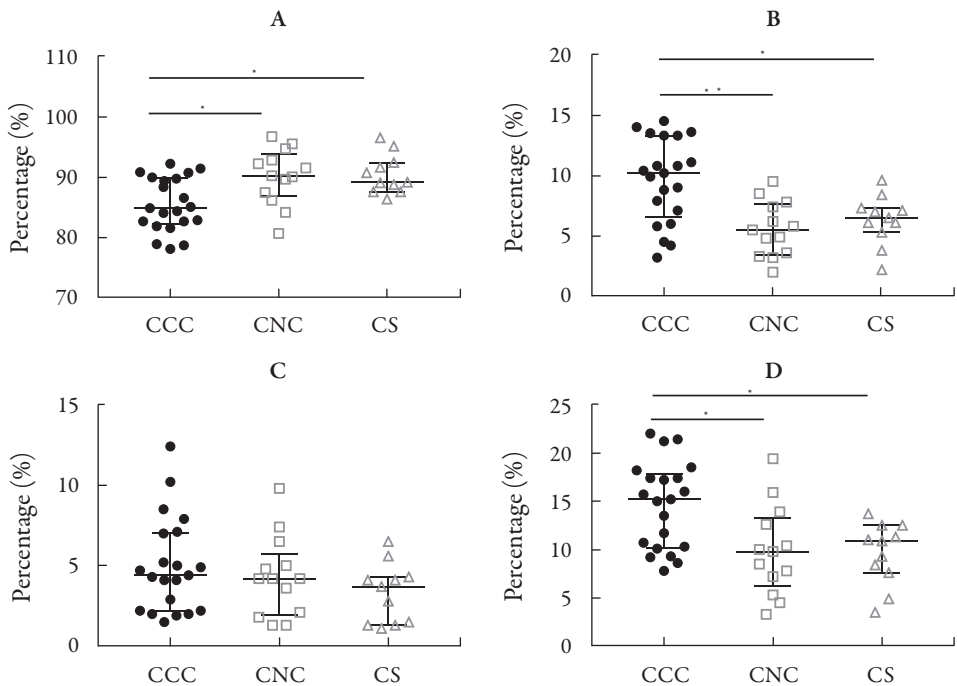


Figure 1. Percentage of subpopulations of classical (A), intermediate (B), non-classical (C) and inflammatory (D) monocytes shown as median and interquartile ranges. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.01$. CCC: chronic chagasic cardiomyopathy; CNC: non-Chagas cardiomyopathy; CS: healthy controls.

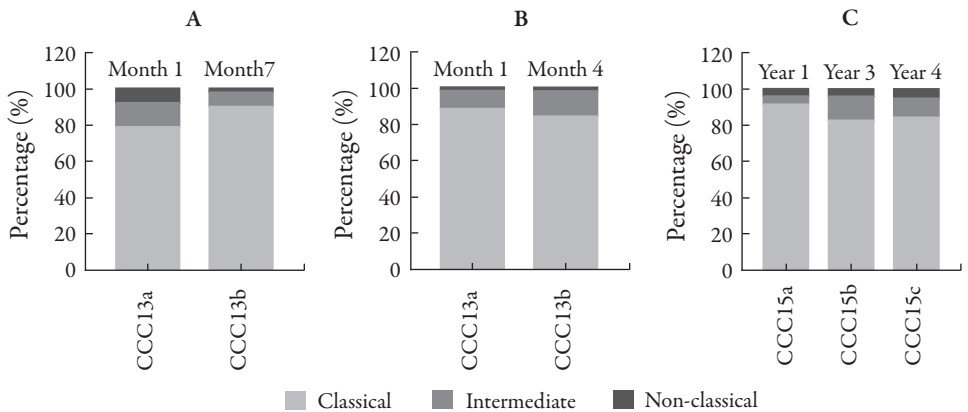


Figure 2. Variation of the percentages of monocyte subpopulations in three patients (A, B and C) with Chagas disease. The analysis were performed with samples taken in a seven months interval (CCC13), four months interval (CCC14), two years between samples a-b and one year between samples b-c (CCC15). CCC: chronic chagasic cardiomyopathy.

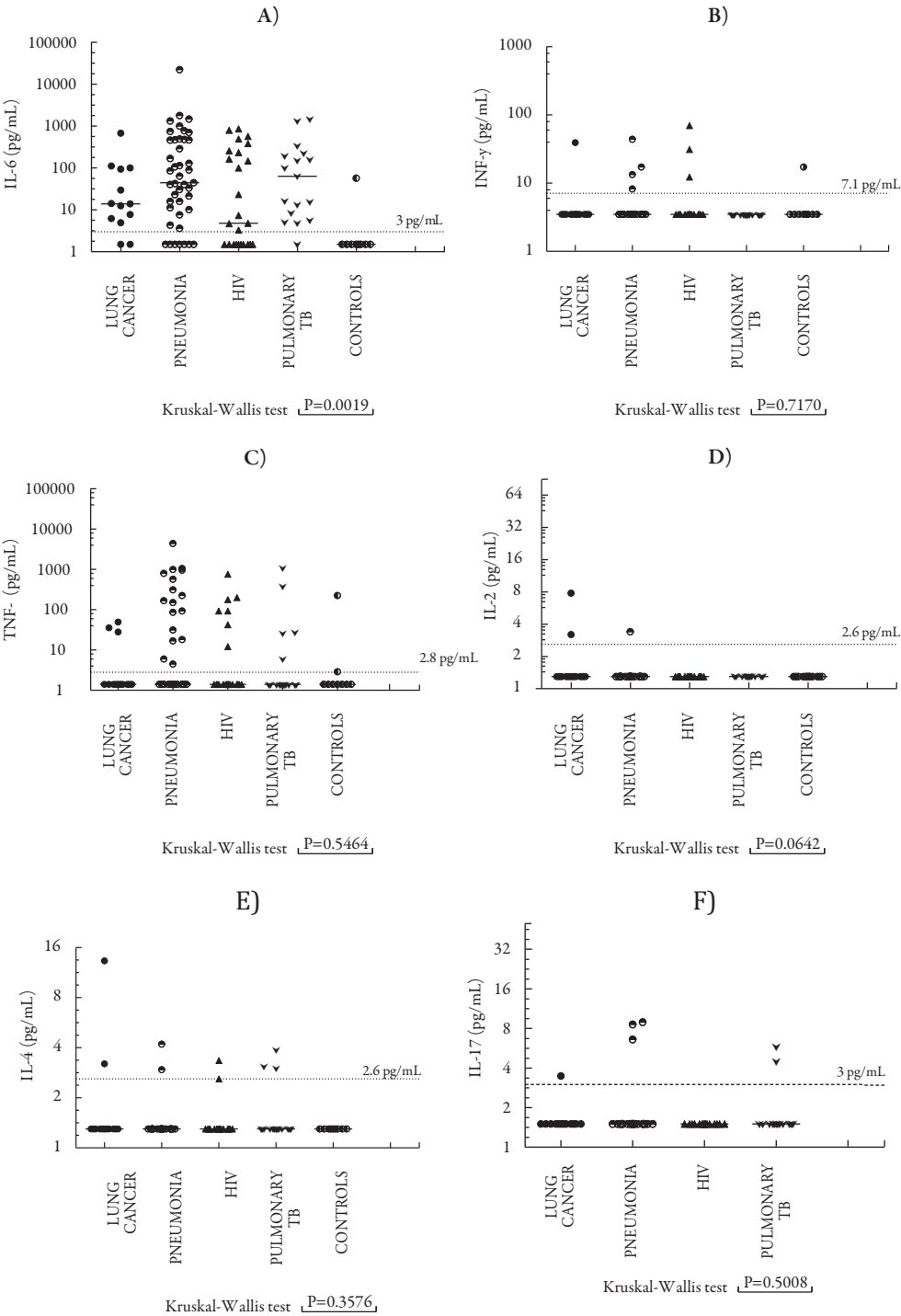
Levels of IFN- γ and proinflammatory cytokines in bronchoalveolar lavage of patients with suspected of pulmonary tuberculosis with negative sputum smear

Paula X. Losada¹, Federico Perdomo¹, Marcela Castro^{1,2}, Carol Salcedo^{1,2}, Giovanni Lastra^{1,2}, Carlos F. Narváez¹

¹ Programa de Medicina, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia.

² Hospital Universitario de Neiva, Neiva, Colombia.

Pulmonary diseases are a common reason for consultation and one of the most important disease is the pulmonary tuberculosis (TB), which is a cause of relevant morbidity and mortality worldwide. In Colombia, *Mycobacterium tuberculosis* infection is considered a public health problem, as our country reports about 12,000 TB cases annually. The diagnostic methods currently available have limitations that don't allow an efficient diagnosis for the timely and accurate management of the disease. Thus, new diagnostic alternatives are necessities. Some immune factors such as cytokines locally released, have been evaluated as complementary diagnosis method. Here, we propose to evaluate whether level of locally secreted proinflammatory cytokines are related to pulmonary TB or other pulmonary diseases. We evaluated samples of Bronchoalveolar lavage (BAL) collected from 107 patients older than 15 years with initial suspicion of TB with negative serial smear. Diagnostic Fibrobronchoscopy was performed in the Pulmonology unit of the Hospital Universitario de Neiva during the years 2014-2016. They were classified within the groups of pulmonary TB, pneumonia, lung cancer and HIV infection. Each of them was documented on the study and procedure and signed the informed consent. Using a commercially available ELISA kit and flow cytometry, the amount of the IL-17, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α , in BAL were quantified. The clinical and epidemiological characteristics of the patients indicate that the group with HIV infected patients were younger than other groups. The weight loss is more frequently reported in patients with lung cancer as described previously (Table 1). The most of the samples measured were lower than limit detection established for the evaluated cytokines except the IL-6 and the detected concentrations do not allow establishing the specific relationship with any of the pathologies analyzed (Figure 1). Funded: Universidad Surcolombiana.



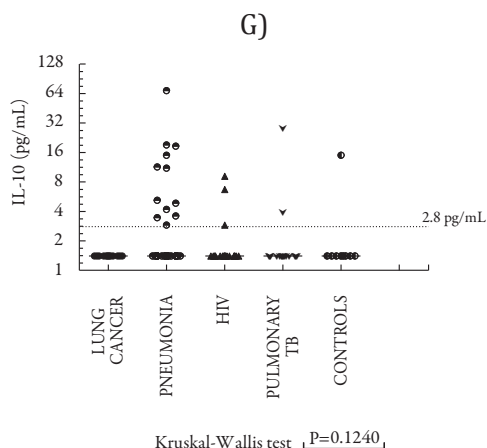


Figure 1. Levels of Proinflammatory cytokines in BAL. Local levels of interleukin (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α , were evaluated by ELISA and flow cytometry in patients with pulmonary TB and other respiratory diseases. Dashed line represented the sensitivity limit of the assay. P value of Kruskal-Wallis test is shown. Each point represents an independent patient. The dotted line represents the sensitivity of the assay.

Genotypic and haplotypic frequencies of Dickkopf-1 gene polymorphisms in patients with early rheumatoid arthritis compared to healthy Colombian controls

Mónica Acevedo-Godoy¹, Alex Darío Cardona-Rincón², Sandra J. Perdomo-Lara¹, Lorena Chila-Moreno¹, Wilson Bautista-Molano^{1,2}, Philippe Chalem Ch.³, Juan Manuel Bello G.², Consuelo Romero-Sánchez^{1,2}

¹ Unit of Basic Oral Investigation (UIBO), Faculty of Dentistry, Universidad el Bosque, Bogotá-Colombia.

² Rheumatology and Immunology Service Hospital Militar Central/Clinical Applied Immunology Group -Faculty of Medicine Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá-Colombia.

³ Foundation Institute of Rheumatology Fernando Chalem, Bogotá, Colombia.

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) and periodontal disease (PD) are destructive chronic inflammatory disorders characterized by the dysregulation of the inflammatory response of the host sharing common bone processes. There are few studies on the role of the Wnt pathway in bone loss in patients with RA and diagnosis of PD. DKK1 is a regulator of bone mass and joint remodeling.

Objectives: To evaluate the genotypic and haplotypic frequency of DKK1 polymorphisms related to bone resorption in patients with early RA (eRA) and healthy controls and its association with indexes of periodontal and rheumatic activity.

Methods: 63 patients with eRA and 67 controls were analyzed. X-rays of the hands and feet were evaluated. The DKK1 polymorphisms (rs1896368, rs1896367, rs1528873)

were evaluated by High Resolution Melting and confirmed by sequencing. Autoantibodies, markers of serological and clinical activity and HLADRB1 were measured. Fisher's exact tests and the Wilcoxon rank tests were used. A logistic model was used to analyze the associations between radiological findings, rheumatic activity, laboratory variables and the presence of DKK1 polymorphisms.

Results: 79.4% of the patients were women and 61.7% and 43.3% had positive rheumatoid factor and citrullinated peptide antibodies respectively. 23% had erosions in feet and 17% joint space narrowing. The healthy controls exhibited the same distribution of age and sex. The frequency of the single nucleotide polymorphism (SNP) rs367 was 43,4% and rs368 was 87,5% in eRA and controls. Polymorphism rs368 was associated with overweight ($p=0.041$). The homozygous genotype of polymorphism rs873 in eRA was 86.7% while in controls the heterozygote was 96.9% with a significant difference ($p=0.001$). Both patients with eRA and controls had polymorphic frequencies of 63.3% for 1 or 2 SNPs and 36.7% for 3 SNPs ($p=0.06$). No significant associations were found between the polymorphisms of DKK1 and rheumatic activity, however, the heterozygous genotype of rs367 was associated with greater frequency of erosions ($p=0.026$) and/or joint space narrowing ($p=0.005$) in feet. Both homozygous and heterozygous patients for rs368 had less radiological damage (OR, 0.04, 95% CI, 0.00-0.93, $p=0.05$). Individuals homozygous for rs367 and heterozygous for rs368 were diagnosed more frequently with PD ($p=0.009$ and $p=0.033$ respectively). No associations were found with the HLA DRB01.

Conclusions: There is genetic homogeneity in the SNPs of risk rs367 and rs368 associated with bone mass deterioration between patients with eRA and controls, with frequencies similar to those reported in healthy Colombian population. However, rs367 seems to be associated with a greater radiological compromise and rs368 confers protection against bone damage in Colombian patients with eRA and PD. The presence of haplotypes and genetic variants of DKK can be affected with polymorphisms of other genes involved in the Wnt pathway.

Preclinical development of a molecularly-defined liposomal vaccine against cutaneous leishmaniasis

David Ernesto Bautista-Erazo¹, Natalia García-Valencia¹, Verónica Guzmán-González¹, Gisela M. García-Montoya², José Robinson Ramírez-Pineda^{1,*}

¹ Grupo Inmunomodulación, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

² Centro Nacional de Secuenciación Genómica, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

* Correspondence: jrobinson.ramirez@udea.edu.co, ramirezpineda@yahoo.com

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a neglected tropical disease that represents a serious public health problem in Colombia. Clinical, epidemiological and experimental evidence

suggests that an effective vaccine against CL is, in principle, possible. However, no effective vaccine for human use is currently available. Using a murine model of CL by *Leishmania (Viannia) panamensis* (LVp), the most prevalent species in Colombia, we found that: 1) synthetic CpG oligonucleotides work as a protective adjuvant when combined with total parasite lysate and 2) a liposomal formulation of soluble total antigen was also protective against parasite challenge. Additionally, the protein trypanothione reductase (TR) was identified as a promising vaccine candidate by using a reverse vaccinology strategy, thus suggesting the possibility to develop a molecularly-defined vaccine formulation. Following this line of research, it was proposed, as a general objective, to evaluate the prophylactic efficacy of both the soluble and micro/nanostructured formulation of the recombinant TR (rTR) combined or not with CpG (soluble/liposomal). First, vaccination was performed using different protocols and dosages of the components (rTR as antigen and CpG as an adjuvant) in two independent experiments. One month after the last booster, mice were infected, and the clinical follow-up was performed (Figure 1). It was observed that vaccination with soluble rTR and CpG induces partial protection against the infectious challenge; however, results were not completely reproducible, and a dose-dependent protection was not demonstrated. Hence, it is of great importance to evaluate whether efficacy of this vaccine candidate could be improved by using a particulate delivery system. To achieve this, protein stability tests were first performed to examine the feasibility of the encapsulation of rTR into liposomes, a process that includes the heating of the protein at high temperatures. Moreover, the preparation of the rTR- or CpG-loaded liposomes was standardized (Figure 2). Different factors involved in the preparation of the vesicles were analyzed and several response variables were studied, such as size, zeta potential, and encapsulation efficiency, to optimize those formulations. We found that rTR is feasible to be encapsulated in liposomes because it was not degraded nor form aggregates by thermal action under manufacturing conditions of the vesicles, so it was possible to standardize a platform for the preparation of micrometric cationic liposomes that encapsulate this protein. Furthermore, cationic liposomes of homogenous suprananometric size were prepared that encapsulate CpG with high efficiency. The resulting molecularly-defined liposomal formulations will be used to evaluate whether protective efficacy can be improved by using particulate delivery systems rather than soluble formulations.

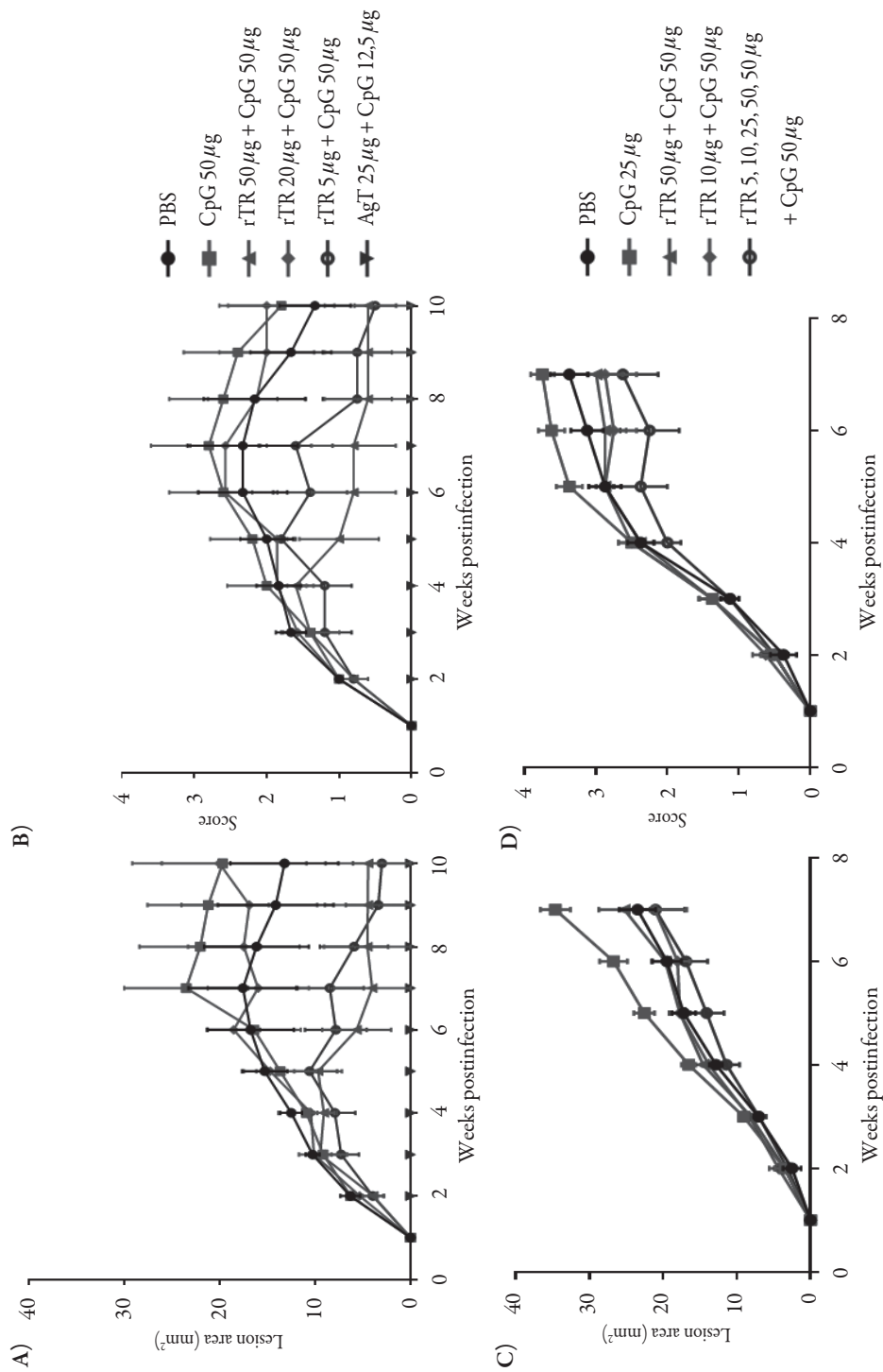


Figure 1. Prophylactic efficacy of soluble rTR. Female BALB/c mice were vaccinated subcutaneously at the base of the tail using different protocols and dosages of the components (rTR as antigen and CpG as adjuvant). One month after the last booster, the animals were infected with 10^5 parasites of *Leishmania (Viannia) panamensis* on the ear. The kinetics of the lesion area (A and C) and the clinical score (B and D) of two independent experiments are plotted. AgT: LVp total antigen.

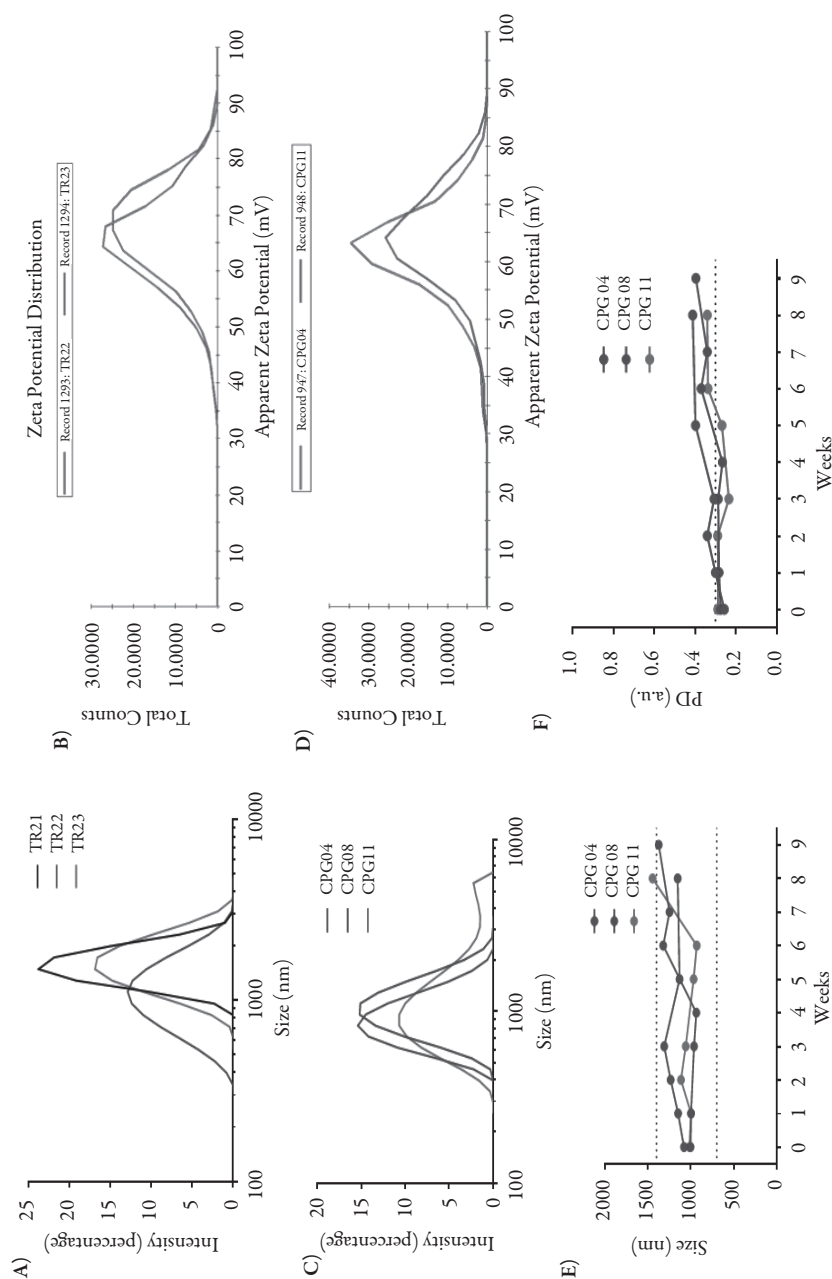


Figure 2. Cationic liposomes containing rTR and CpG. (A) Size distribution of three batches of rTR-loaded liposomes produced under the same conditions. Average PDI: 0.15. (B) Distribution of apparent zeta potential (mV) of two batches of rTR-loaded liposomes which show a similar approximate peak of +65 mV. (C) Size distribution of three batches of CpG-loaded liposomes. (D) Distribution of apparent zeta potential (mV) of two batches of CpG-loaded liposomes which show a similar approximate peak of +65 mV. (E-F) Stability of the CpG-loaded liposomes over time (weeks) in terms of variation of the (E) size (nm) and (F) PDI (a.u.). It is indicated in (E), with dotted horizontal lines, the sizes that are considered adequate: between 700 nm and 1400 nm. In (F), the dotted horizontal line indicates the maximum value of PDI considered acceptable: 0.3. PDI: polydispersity index, a.u.: arbitrary unit.

Standardization of a protocol for RNA isolation from urinary sediment for the search of biomarkers involved in acceptance or rejection of the kidney allograft

Carlos Andrés Carmona, Cristiam Mauricio Álvarez

Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

In spite of the improvement in the management of immunosuppressive treatments as well as in the understanding of the role of the immune system in kidney allograft outcomes, rejection is still the most important limitation for renal graft function and survival.

The growing number of patients requiring a kidney transplant in contrast to the notable decrease in the number of donors, together with the occurrence of rejection events, reveal the importance of addressing research from different perspectives, in order to propose sensitive and non invasive diagnostic, prognostic and follow-up tools.

Searching of biomarkers associated to kidney allograft outcome, has become an important research target in this area. Nevertheless a set of biomolecules related to state, function and outcome of kidney allografts has not been well defined yet.

Based on the above, we propose that differentially expressed transcripts in urine of kidney allograft recipients with different outcomes (either acceptance or rejection), might constitute a useful tool in monitoring the graft as well as in understanding immune processes occurring *in situ* at organ level.

Urine is a non invasive and easy to obtain sample. However, due to its composition is at the same time a hostile environment for RNA. Although researchers in prior studies have implemented commercial kits for RNA isolation from urinary sediment, information regarding to yields and quality and integrity of isolated RNA is not well described. Therefore, a protocol for RNA extraction from urine sediment for usage in next generation sequencing technologies (e.g RNA – Seq) is required.

Among the different protocols that we have implemented in our lab for the isolation of RNA, are included those provided by comercial kits and the Trizol reagent. Comercial kits have not displayed neither good yields (low concentration) nor quality (low 260/280; 260/230 relations) or integrity (no observation of 18S and 28S bands). Conversely, usage of Trizol reagent has displayed both good yields and optimal quality and integrity in terms of nucleic acid concentration, good 260/280; 260/230 relations and presence of 18S and 28S ribosomal RNA bands. The protocol was adapted from *Optimization of total RNA isolation from human urinary sediment*, Monteiro et al., 2016, and is suitable for the isolation of optimal RNA for its implementation in RNA sequencing.

Symptomatic individuals with previous natural dengue infection have a higher frequency of dengue-specific T cells against NS3, NS4b AND NS5 viral proteins

Karina I. Torres^{1*}, Félix G. Delgado^{1,2}, Jaime E. Castellanos¹, María Consuelo Romero², Claude Roth³

¹ Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, D. C., Colombia.

² Unidad de Investigación Básica Oral, Universidad El Bosque, Bogotá, D. C.

³ Functional Genetics of Infectious Diseases Unit, Pasteur Institute, Paris, France.

Dengue is the most common mosquito-borne human viral diseases that cause a range of clinical outcomes which 70% are asymptomatic. Some authors argue that the cellular immune response could be different between humans who have presented symptoms or not. In addition, it has been showed that T cell responses influences strongly the protection against the infection. The aim of this work was to find differences of T cell response between individuals who had presented evidence of apparent clinic symptoms or not. The frequency of antigen-specific IFN- γ producing T cells against peptides from non-structural viral proteins NS3, NS4b y NS5 of dengue virus (DENV) was quantified in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors. They were assessed by ELISpot in 49 samples using the peptides NS3 (34-44), NS5 (435-443), NS4b (389-397), NS3 (299-316), NS3 (259-267), NS4b (352-359), NS5 (522-531), NS3 (54-63), NS3 (203-211), NS3 (245-254), NS4b (342-350). The sequences of the peptides belong to conserved regions between the four serotypes and restricted to the most common HLA class I alleles in Colombia (A*02, A*24, B*07 y B*35) and are included in a group of epitopes from a DNA vaccine candidate against dengue from the Institut Pasteur (Paris, France). We found that 35 out of 49 donors were identified as seropositive and 8 of them reported characteristic clinical symptoms of the disease. The frequency of dengue-specific T cells against peptides NS5 (522-531) (HLA-B*07 restricted), NS3 (203-211), NS3 (245-254) and NS4b (342-350) (HLA-B*35 restricted) in this group (median values of 180, 388, 403 y 239 SFC/10⁶ respectively) were significantly higher ($p < 0.005$) than the frequency quantified in individuals without apparent symptoms of disease (median values of 21, 15, 13, 14 SFC/10⁶ PBMCs respectively). Although it is not clear the correlation between higher T cell response and development of symptoms or severe forms of disease, it is necessary to explore the polyfunctionality of this cellular response in order to get more information about its ability to induce disease protection.

Global DNA methylation in immune cells of patients with systemic lupus erithematosus and its relationship with disease activity and environmental exposure

Research proposal

Carolina Hurtado Montoya¹, Elsa María Vásquez Tres Palacios¹, Rodrigo Antonio Urrego Álvarez², Liliana Yasmín Acevedo Sáenz³, Gloria Vásquez⁴

¹ Escuela de Graduados y Facultad de Medicina, Universidad CES.

² Grupo de Investigación en Ciencias Animales CES (INCA-CES) y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES

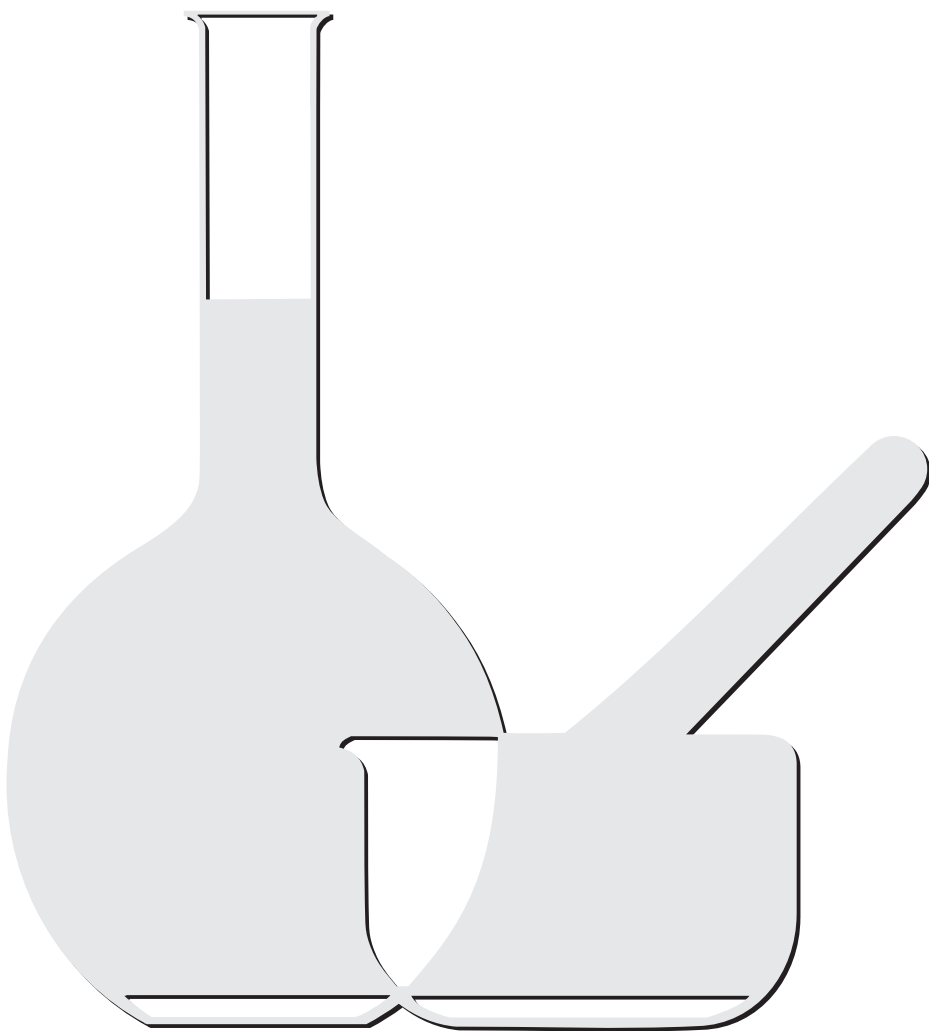
³ Grupo de Ciencias Básicas de la Facultad de Medicina y Escuela de Graduados, Universidad CES.

⁴ Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, GICIG, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia.

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a disease of multifactorial origin and can affect various systems and organs. Tissue damage is caused by the production of auto-antibodies against different components of the nucleus or cell. The wide spectrum of clinical manifestations explains the heterogeneity in its presentation and causes difficulties in the diagnosis. The classification criteria of the ACR (American College of Rheumatology) or SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics) have been adapted, however, they have limited sensitivity and specificity. The diagnostic tests available as ANA (Antinuclear Antibodies) and anti-dsDNA (Antibodies against double-stranded DNA), not only have sensitivity and specificity problems, but are also frequently positive in other autoimmune diseases.

The percentage of global DNA methylation as an epigenetic change has been proposed as a biomarker with specific cut-off points for the early detection of cancer patients. Although changes have been described in the global DNA methylation of different immune cells in patients with SLE, it has not yet been described whether or not there are cut-off points for each cell population, which may maximize the possibility of discriminating between patients with SLE of healthy individuals and between the different states of disease activity.

The technique that is mainly used to measure DNA methylation patterns is bisulfite sequencing, with high costs, risks and technical difficulties. In the present study we propose the measurement of global DNA methylation through flow cytometry, with advantages such as speed, accessibility and lower cost, important benefits in the context of a diagnostic and follow-up test. In addition, cytometry allows to characterize markers of interest cell by cell, which provides simultaneous information of the different cell subtypes.



NORMAS PARA PUBLICACIÓN

La Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas es editada por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá), con una periodicidad cuatrimestral y tiene como objetivo publicar artículos originales de diversos tópicos relacionados con las ciencias farmacéuticas, tales como recursos naturales, atención farmacéutica, evaluación clínica y preclínica, y los relacionados con la industria farmacéutica, la salud y los medicamentos.

Además de artículos completos, la revista acepta revisiones, comunicaciones breves y cartas al editor. Las contribuciones pueden enviarse en español, portugués o inglés, en letra Times New Roman, tamaño 12, especificando el procesador de textos utilizado, al correo electrónico rcciquifa_fcbog@unal.edu.co o a través del sistema OJS en el sitio web: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa>.

Todo el material propuesto para publicación será revisado por el comité editorial, y luego de su aceptación para evaluación, será sometido a revisión por pares académicos. Las evaluaciones recibidas por el comité editorial serán remitidas al autor para que se realicen los ajustes sugeridos. Los autores tendrán un lapso de tres semanas para responder cada una de las observaciones, introducir en el texto las modificaciones del caso y retornar el documento corregido al comité

editorial. Después de que los evaluadores o el comité editorial lleven a cabo una segunda revisión del manuscrito, la revista comunicará a los autores la decisión sobre la publicación o no del mismo. Los manuscritos deberán acompañarse de una carta firmada por todos los autores en la cual se declare que el trabajo es inédito; es decir, que el artículo ni parte de él ha sido publicado o está en vía de publicación en otra revista, y en la que se responsabilizan por la información publicada. Se entiende claramente que los trabajos enviados no están siendo considerados para su publicación en otros medios.

Los manuscritos deben ir a doble espacio, incluyendo tablas, con un mínimo de 2,5 cm de margen por todos los lados. No se admiten notas a pie de página.

Todos los manuscritos deben incluir:

- Título, centrado y minúscula.
- Autor(es), cursiva, izquierda, incluyendo dirección postal completa, correo electrónico y fax.
- Resumen y Summary. Al principio del manuscrito y con título centrado. Incluye la justificación del estudio y los principales hallazgos y conclusiones, debe tener entre 50 y 200 palabras. Incluir además el título del artículo y el resumen en inglés (Summary) independiente del idioma del manuscrito.
- Palabras clave (debajo del Resumen) y Key words (debajo de Summary). De tres a seis palabras en minúscula,

excepto la primera, y separadas por coma y espacio. Preferiblemente tomadas del Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>).

Los artículos se dividirán en las siguientes secciones: introducción, metodología, resultados y discusión, agradecimientos y referencias. Los títulos deben estar separados por dos espacios en sus partes superior e inferior, centrados y en negrilla. Los detalles acerca de la metodología experimental utilizada deberán ser lo suficientemente claros como para repetir la experimentación.

Las tablas deben llevar numeración arábiga de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir en su parte superior y las notas en la parte inferior. En los encabezamientos de las columnas se deben anotar los símbolos de las unidades utilizadas. Las fotografías, gráficas, dibujos y esquemas se denominan 'figuras' y deben llevar numeración arábiga de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir debajo de la figuras.

Los artículos relacionados con experimentación con animales deben ajustarse plenamente a los lineamientos éticos trazados por la Organización Mundial de la Salud. Los extractos o fracciones evaluados *in vitro* o *in vivo* deben definirse químicamente, cuando menos en cuanto a la clase de constituyente. El material vegetal deberá estar clasificado botánicamente.

Las abreviaturas de pesos y medidas serán las indicadas por la Farmacopea de los

Estados Unidos en su edición oficial o unidades SI.

Los datos espectroscópicos se deben presentar de la siguiente manera:

UV λ max (solvente ϵ) nm (log ϵ). Ej.: UV λ max (MeOH) 275 (log ϵ 2.94).

IR ν max (medio) cm^{-1} . Ej.: IR ν max (KBr) 1740, 1720 cm^{-1} .

EM m/z (% intensidad relativa). Ej.: em m/z (%): 340 (M^+ , 100), 295 (10), 134 (26) ...

RMN ^1H (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (integración, multiplicidad, J en Hz, asignación). Ej.: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 3.84 (1H, *d*, J = 10.3 Hz, H-30).

RMN ^{13}C (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (multiplicidad, asignación). Ej.: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz) 16.60 (t, C-12).

Las abreviaturas usadas para describir la multiplicidad de las señales en RMN son: *s* = singlete, *d* = doblete, *t* = triplete, *m* = multiplete, *dd* = doble de dobletes, *ddd* = doble de doble de dobletes.

Las abreviaturas para los solventes y reactivos más comúnmente usados son: EtOH = etanol, MeOH = metanol, CHCl_3 = cloroformo, C_6H_6 = benceno, AcOEt = acetato de etilo, EP = éter de petróleo, Me_2CO = acetona, DMSO = dimetilsulfóxido, AcOH = ácido acético.

Se evitará el uso excesivo de tablas y figuras que estarán numeradas y que se ane-

jarán en hojas separadas con su respectiva descripción.

Las referencias se citarán en el texto con su respectiva numeración. Solo se pueden citar tesis y libros o artículos que hayan sido publicados. Deben incluir: autor(es), título de la publicación, año, volumen y páginas, de la siguiente manera:

Revistas: Iniciales del nombre y apellido completo de todos los autores, título completo del artículo, nombre abreviado o nombre completo de la revista dependiendo si aparece en el Chemical Abstract o en índices equivalentes. La referencia se cita en letra itálica, volumen en negrilla, páginas inicial y final, y año entre paréntesis. Ej.:

1. H.P. Baden, L.A. Goldsmith, B. Fleming, A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues, *Bioch. Biophys. Acta*, **322**, 269-278 (1973).

Comunicaciones personales: iniciales del nombre, apellido completo e institución, seguido por las palabras comunicación personal y el año. Ej.:

2. A.J.M. Leeuwenberg, Agricultural University, Wageningen, Holanda, comunicación personal, 1984.

Libros: iniciales del nombre y apellido completo de los autores, título del libro entre comillas, editorial, ciudad, año, volumen y página. Ej.:

3. D.R. Morris, "The Biochemistry of Disease", Morris et Marton Eds., London, 1981, Vol. 8, p. 223.

Capítulos de libros escritos por varios autores: iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del capítulo, seguido de la palabra En: título del libro entre comillas, editores, editorial, ciudad, año, volumen, páginas. Ej.:

4. A.D. Elbein, R.J. Molyneux, The chemistry and biochemistry of simple indolizidine and related polyhydroxy alkaloids. En: "Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives", Ed. por S.W. Pelletier, Wiley, New York, 1987, Vol. 5, pp. 1-54.

Tesis: Autores, título seguido de la palabra Tesis de..., institución, año, páginas. Ej.:

5. F. Salcedo, "Contribución al estudio de las Cinchonas colombianas", Tesis de Grado, Universidad del Valle, 1983, pp. 14-16.

Referencias de Internet: Inicial del nombre y apellido completo del autor, título del documento, dirección URL y fecha de revisión. Ej.:

6. Lipidat, Lipid thermotropic phase transition database, Ohio State University, URL: <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>, consultado en septiembre de 2001.

La correspondencia debe enviarse a la siguiente dirección:

Comité Editorial

Revista Colombiana de Ciencias
Químico-Farmacéuticas
Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia

Cra. 30 N.º 45-03

Fax: 57-1-3165060

Bogotá – Colombia

Correo electrónico:

rcciquifa_fcbog@unal.edu.co

Dirección WEB:

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcciquifa>

Igualmente, los manuscritos pueden enviarse al correo electrónico:

rcciquifa_fcbog@unal.edu.co

*Revista Colombiana
de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 47(2)*
se terminó de editar, imprimir y encuadernar
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos
Bogotá, D. C., Colombia.



